

**CLÁUDIA NOGATA**

**ESTUDO DA TRANSFERÊNCIA LIPÍDICA DE LINFÓCITOS  
PARA O TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DE RATO  
DIABÉTICO *in vitro***

**CURITIBA  
2004**

**CLÁUDIA NOGATA**

**ESTUDO DA TRANSFERÊNCIA LIPÍDICA DE LINFÓCITOS  
PARA O TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DE RATO  
DIABÉTICO *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de concentração em Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

**CURITIBA  
2004**

Aos meus pais que sempre  
me apoiaram e incentivaram

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Eduardo e Irene pelo amor e dedicação sempre, mesmo à distância, pela confiança e por sempre compreenderem e incentivarem as minhas escolhas.

Ao Professor Dr. Luiz Cláudio Fernandes pela orientação neste trabalho, pela atenção, paciência pelo exemplo de dedicação pela oportunidade de trabalhar neste laboratório, pela confiança mas principalmente pela sua amizade. Não poderia deixar de agradecer também as boas dicas, desde um bom livro até “coisas da vida”, e pelos vários momentos de reunião do grupo que me trouxeram muitas alegrias.

Aos Professores do Departamento de Fisiologia e Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná pelo incentivo.

Ao Professor Rui Curi do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelo incentivo financeiro às pesquisas realizadas no nosso laboratório.

À Professora Anita Nishiyama pelo incentivo e por me instigar neste trabalho.

À Professora Alessandra Folador pela amizade, carinho e por todos os momentos de confraternização do grupo.

Aos amigos Júlia, Rica, Nathalia, Dalva, Rica Chair, Rogéria, Evinho, Sandrinho, Maressa, Gleisson, Loli, Maurício, Evelise, Vanessa, Rodrigo, Dani pela amizade, pela força e alegria que me proporcionaram, pelo companherismo, pelas confidências (de uma quase adolescente), conselhos, por tudo que aprendi com cada um de vocês e por fazerem parte da minha história.

Às minhas irmãs Márcia e Angela pela amizade, pelos momentos de bobeira, pelo apoio e pelas cartinhas que me lembram um pouco de como é bom estar em casa.

Ao dono do coração Júnior pelos cuidados e por viver ao meu lado.

À amiga Vivi pela *big* compreensão e amizade, pelos momentos de ajuda mútua, pelas conversas filosóficas e por todos os momentos que passamos juntas.

À família Mantovani Benevenuto pelo carinho, respeito e atenção desde o tempo de pensionato. Ah! e também pelos cuidados especiais.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>Lipídios e ácidos graxos.....</b>	<b>1</b>
<b>Metabolismo de linfócitos e macrófagos.....</b>	<b>2</b>
<b>Transferência lipídica entre células .....</b>	<b>5</b>
<b>Possíveis efeitos dos ácidos graxos sobre o músculo esquelético .....</b>	<b>8</b>
<b>Metabolismo dos ácidos graxos na Diabetes .....</b>	<b>9</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1 Animais .....	12
3.2 Indução de diabetes.....	12
3.3 Determinação da glicemia .....	13
3.4 Ácidos graxos .....	13
3.5 Obtenção e contagem de linfócitos .....	15
3.6 Cultura de linfócitos com [ <sup>14</sup> C]-ácidos graxos .....	15
3.7 Co-incubação de linfócitos e músculo esquelético .....	16
3.8 Extração lipídica .....	17
3.9 Cromatografia dos lipídios totais em camada delgada .....	18
3.10 Oxidação dos [ <sup>14</sup> C]-ácidos graxos pelos linfócitos .....	20
3.11 Análise estatística.....	20
3.12 Cálculo.....	21
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
<b>Incorporação de [<sup>14</sup>C]-ácidos graxos pelos linfócitos.....</b>	<b>22</b>
<b>Transferência de [<sup>14</sup>C]-ácidos graxos de linfócitos para o músculo .....</b>	<b>22</b>
<b>Incorporação dos [<sup>14</sup>C]-ácidos graxos no músculo.....</b>	<b>28</b>
<b>Taxa de descarboxilação do AP pelos linfócitos .....</b>	<b>33</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG	ácido graxo
AA	ácido araquidônico
AO	ácido oléico
AL	ácido linoléico
AP	ácido palmítico
A $\alpha$ L	ácido $\alpha$ -linolênico
ATP	trifosfato de adenosina
AE	atividade específica
AGL	ácido graxo livre
ANOVA	<i>one-way analysis of variance</i>
BSA	albumina bovina sérica
CC	corpos cetônicos
CoA	coenzima A
Col	colesterol
DGLA	ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico
DHA	ácido docosahexaenóico
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DMNID	<i>Diabetes mellitus</i> não insulino-dependente
DMID	<i>Diabetes mellitus</i> insulino-dependente
DPM	desintegração por minuto
Ecol	éster de colesterol
EPA	ácido eicosapentaenóico
FABP	proteína ligante de ácidos graxos
FL	fosfolipídio
FC	fosfatidilcolina
GLUT-4	transportador de glicose-4
HDL	lipoproteína de alta densidade
IRS-1	substrato para receptor de insulina-1
IL-1	interleucina-1
IL-2	interleucina-2
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$

LLP	enzima lipase lipoprotéica
LP	lipídios polares
ME	músculo esquelético
NADH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida
PGE	prostaglandina
PGI	prostaciclina
PDH	enzima piruvato desidrogenase
PKB	proteína quinase-B
PI-3quinase	fosfatidil-inositol 3-quinase
PBS	tampão fosfato salina
PUFA	ácidos graxos poliinsaturados
RI	resistência periférica à insulina
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucleico mensageiro
TAG	triacilglicerol
TCM	triacilglicerol de cadeia média
TCL	triacilglicerol de cadeia longa
TNF	fator de necrose tumoral
TCA	ácido tricloroacético
TLC	cromatografia de camada delgada

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01** - Vias de metabolização da glutamina e glicose nos linfócitos e macrófagos até a geração e exportação dos lipídios. Os lipídios formados podem ser incorporados na fração celular ou serem exportados (HOMEM de BITTENCOURT *et al.*, 1993; PERES *et al.*, 1997 e CURI & PERES, 2002). .....4
- FIGURA 02** - Resultados de transferência de lipídios entre células já obtidos até o ano de 2002 (PERES, 1997, GARCIA Jr *et al.*, 2001 e CURI & PERES, 2002). .....7
- FIGURA 03** - Transferência lipídica entre células do Sistema Imunitário para o tecido muscular esquelético, realizado pela primeira vez por Pardal (2002). .....7
- FIGURA 04** - Estrutura química dos ácidos graxos radioativos utilizados neste estudo. .... 14
- FIGURA 05** - Representação da incubação dos músculos do grupo controle e diabético. .... 17
- FIGURA 06** - Representação da placa cromatográfica de sílica-gel com as marcações do local de aplicação das amostras. .... 19
- FIGURA 07** - Taxa de incorporação do Ácido [1-<sup>14</sup>C]-Araquidônico (0.1 µCi/mL) pelos linfócitos de ratos normais e diabéticos, após 6h de cultura. Taxa de exportação para o meio e transferência para o músculo sóleo (30 mg) de ratos normais e diabéticos, após 3h de co-incubação (3 mL). Os resultados representam a média ± epm, de 2 experimentos em quadruplicata . .... 24
- FIGURA 08** - Taxa de incorporação do Ácido [1-<sup>14</sup>C]-Oléico (0.1 µCi/mL) pelos linfócitos de ratos normais e diabéticos, após 6h de cultura. Taxa de exportação para o meio e transferência para o músculo sóleo (30 mg) de ratos normais e diabéticos, após 3h de co-incubação (3 mL). Os resultados representam a média ± epm, de 2 experimentos em quadruplicata. .... 25
- FIGURA 09** - Taxa de incorporação do Ácido [1-<sup>14</sup>C]-Linoléico (0.1 µCi/mL) pelos linfócitos de ratos normais e diabéticos, após 6h de cultura. Taxa de exportação para o meio e transferência para o músculo sóleo (30 mg) de ratos normais e diabéticos, após 3h de co-incubação (3 mL). Os resultados representam a média ± epm, de 2 experimentos em quadruplicata. .... 26
- FIGURA 10** - Taxa de incorporação do Ácido [U-<sup>14</sup>C]-Palmítico (0.1 µCi/mL) pelos linfócitos de ratos normais e diabéticos, após 6h de cultura. Taxa de exportação para o meio e transferência para o músculo sóleo (30 mg) de ratos normais e diabéticos, após 3h de co-incubação (3 mL). Os resultados representam a média ± epm, de 2 experimentos em quadruplicata. .... 27
- FIGURA 11** - Taxa de descarboxilação do Ácido Palmítico pelos linfócitos obtidos de ratos normais e diabéticos, após 1h. Os dados representam a média ± epm de 2 experimentos em quintuplicata. \* p < 0,05 quando comparado ao controle.....34



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 01</b> - Distribuição do Ácido [1-14C]-Araquidônico (pmol/g tec. e %) nas diferentes frações lipídicas do músculo esquelético co-incubado com linfócitos obtidos de ratos normais e diabéticos. Os resultados em pmol/g tecido representam a média de 2 experimento em quadruplicata.....	29
<b>TABELA 02</b> - Distribuição do Ácido [1-14C]-Oléico (pmol/g tec. e %) nas diferentes frações lipídicas do músculo esquelético co-incubado com linfócitos obtidos de ratos normais e diabéticos. Os resultados em pmol/g tecido representam a média de 2 experimento em quadruplicata.....	30
<b>TABELA 03</b> - Distribuição do Ácido [1-14C]-Linoléico (pmol/g tec. e %) nas diferentes frações lipídicas do músculo esquelético co-incubado com linfócitos obtidos de ratos normais e diabéticos. Os resultados em pmol/g tecido representam a média de 2 experimento em quadruplicata.....	31
<b>TABELA 04</b> - Distribuição do Ácido [U-14C]-Palmítico (pmol/g tec. e %) nas frações diferentes lipídicas do músculo esquelético co-incubado com linfócitos obtidos de ratos normais e diabéticos. Os resultados em pmol/g tecido representam a média de 2 experimento em quadruplicata.....	32

## RESUMO

Os linfócitos e macrófagos são capazes de sintetizar, exportar e transferir lipídios entre si constituindo um mecanismo de sinalização entre células do sistema imunitário. As células leucocitárias também transferem lipídios para enterócitos e ilhotas de Langerhans, desempenhando papel importante na modulação da funcionalidade destes tecidos. Pela primeira vez na literatura, nosso grupo mostrou que a transferência lipídica também ocorria entre células do sistema imunitário, no caso os linfócitos, e a musculatura esquelética (ME) constituindo em fonte adicional de ácidos graxos (AG). Não havia, ainda, na literatura nenhum trabalho que tenha investigado este fenômeno de transferência lipídica em situações patológicas.

Visto que os linfócitos são capazes de transferir AG também para o ME, nos propomos a investigar este perfil de transferência lipídica em animais diabetizados com aloxana. Após a cultura dos linfócitos na presença dos AG radiomarcados durante 6 horas, seguida de co-incubação com o ME, nossos resultados demonstram que o [ $^{14}\text{C}$ ]-ácido araquidônico (AA) é o que tem maior taxa de incorporação pelos linfócitos e transferência deste para o ME, tanto de ratos saudáveis quanto diabéticos, quando comparado com os outros AG. Os linfócitos de ratos diabéticos têm menor taxa de incorporação de [ $^{14}\text{C}$ ]-ácidos araquidônico, oléico (AO), linoléico (AL) e palmítico (AP), quando comparado com o controle. Entretanto, a taxa de transferência para o ME foi a mesma. Na situação de diabetes, o fracionamento dos AG provenientes dos AA e [ $^{14}\text{C}$ ]-AL no ME é desviada da fração fosfolipídica para as outras frações, principalmente TAG. Diferentemente, a maior parte do AG proveniente do [ $^{14}\text{C}$ ]-AO é incorporada em fosfolipídios (FL). Talvez, estes resultados possam ser atribuídos à ausência da insulina, uma vez que, no modelo de diabetes estudado (DM tipo I induzido por aloxana), este hormônio está ausente.

O aporte de AG fornecido pelos linfócitos poderia ser um mecanismo importante para modular a função da musculatura esquelética, além de fornecer substrato energético, principalmente durante o exercício físico prolongado e também em situações patológicas como diabetes.

## ABSTRACT

Lymphocytes and macrophages are able to synthesize, export and transfer lipids among them and this can constitute a mechanism of signaling between the cells of the immune system. Leukocytes also can transfer lipids to enterocytes and Islet of Langerhans playing a key role in the modulation of these cells. Our group was the first one to show that lymphocytes were able to transfer fatty acids to skeletal muscle, which could be an additional source of fatty acids. There is no report on this subject in pathological situation.

The goal of this work was to investigate the profile of lipid transfer from leukocytes to skeletal muscle from rats made insulin deficient by aloxan. Lymphocytes were cultivated during 6 hours in the presence of labeled radiochemical fatty acids and co-incubated during 3 hours with soleus skeletal muscle. [ $^{14}\text{C}$ ]-Arachidonic acid (AA) was the most incorporated by lymphocytes and also the most transferred to skeletal muscle considering health and diabetic state, when compared to the others fatty acids. Lymphocytes from diabetic rats have lower incorporation rate of AA, oleic acid (OA), linoleic acid (LA) and palmitic acid (PA), when compared to control. However, the rate of fatty acid transfer to skeletal muscle was the same. In the diabetic state, fatty acid from AA and LA in the skeletal muscle were incorporated mainly in triacylglycerol. AO was incorporated mainly in phospholipids. These results can be explained, perhaps, by the absence of insulin in these animals.

Our results suggest that the fatty acid supplied by the lymphocytes to the skeletal muscle can be an important mechanism to modulate its function, beside its role as an energy substrate in particular during intense and long exercises as well as in pathological conditions such as diabetes.

## 1 INTRODUÇÃO

### Lipídios e ácidos graxos

Lipídios são substâncias que não são solúveis em água, como óleos, gorduras, ceras e esteróides que desempenham diversos papéis no nosso organismo. São formados a partir de ácidos graxos (AG), ácidos carboxílicos que podem ser saturados quando há apenas ligações simples entre os átomos de carbono e como insaturados quando há duplas ligações entre os carbonos da cadeia (CAMPBELL, 1999). Os AG saturados com 2-4 átomos de carbono, são considerados AG de cadeia curta ou voláteis; 6-12, AG de cadeia média e 14-24 cadeia longa (GRAZIOLA, SOLIS e CURI, 2002).

Nos AG, o carbono mais distante da carboxila é denominado de carbono ômega ( $\omega$ ) e conforme a posição da última insaturação em relação a este carbono, podem ser classificados em  $\omega$ -9 monoinsaturado como o ácido oléico (C18:1  $\omega$ -9), presente no óleo de oliva e no óleo de semente de cajú;  $\omega$ -6 diinsaturado como o ácido linoléico (C18:2  $\omega$ -6), constituinte dos óleos de linhaça;  $\omega$ -3 triinsaturado  $\alpha$ -linolênico (C18:3  $\omega$ -3), principal constituinte dos óleos de peixe (VIANNI e BRAZ-FILHO, 1995).

Os principais AG de cadeia longa que compreendem a maior porção dos AG circulantes (95%) são oléico (43%), palmítico (24%), esteárico (13%), linoléico (10%) e palmitoléico (5%) (CURI e PERES, 2002). A concentração plasmática destes AG pode variar de 0,3 até no máximo 2 mM em condições extremas, sendo encontradas concentrações mais baixas logo após a alimentação devido à ação da insulina, que inibe a lipólise no tecido adiposo e promove a esterificação dos AG e glicerol, em triacilglicerol (TAG) nos adipócitos (GARCIA Jr, LAGRANHA e PITHON-CURI, 2002). No entanto, concentrações plasmáticas de AG mais elevadas podem ser observadas durante o jejum, exercício físico e diferentes formas de estresse, que provocam a liberação de hormônios lipolíticos (OTTON e CURI, 2002).

Os AG são fontes de energia importantes para vários tecidos, principalmente o músculo esquelético. Podem ser armazenados na forma de TAG e quando estes estoques são mobilizados, há liberação dos AG, que são exportados para a circulação para que sejam utilizados em outro local. A maior parte do AG incorporado pela célula é esterificado em fosfolipídios (FL) e éster de colesterol (Ecol), mas também pode ser utilizado para síntese de prostaglandinas (PGE) e outros metabólitos sinalizadores (HAMILTON e KAMP, 1999).

Além da função energética e estrutural, os AG podem controlar a secreção de insulina e a resposta periférica a este hormônio (CHEN e REAVEN, 1999). Ou seja, desencadeiam alterações metabólicas e modulam os efeitos dos hormônios. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) como  $\omega$ -3, são capazes de aumentar a ligação da insulina ao seu receptor no ME (SIMOPOULOS, 1994; STORCH e THUMSER, 1999). Este efeito parece ser decorrente de alterações na composição fosfolipídica da membrana plasmática, mostrando que, os AG podem interferir na ação da insulina de acordo com as vias específicas de sinalização que eles afetam (STORCH e THUMSER, 1999). Diferentemente, os AG saturados, como o AP, modificam a ação da insulina no ME reduzindo a fosforilação da IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase (McARTHUR *et al.*, 1999).

Os AG são transportados no plasma ligados à albumina ou lipoproteínas e os mecanismos de translocação destes através da membrana plasmática ainda não estão esclarecidos. Há hipóteses de que os AG não ionizados atravessam a membrana por simples difusão de acordo com o gradiente de concentração, devido ao caráter hidrofóbico destas espécies químicas e da membrana celular (KAMP e HAMILTON, 1993; HAMILTON e KAMP, 1999). Porém, recentemente, algumas proteínas transportadoras (FATP - fatty acid-transport protein) e ligantes de AG (FABP - fatty acid-binding protein) foram identificadas na membrana celular e também no seu citosol (URIEL, TORRES e ANEL, 1994; LUIKEN *et al.*, 1999; HAMILTON e KAMP, 1999; McARTHUR *et al.*, 1999; STORCH e THUMSER, 2000 e TURCOTTE, 2000).

### **Metabolismo de linfócitos**

Linfócitos maduros recirculam via sangue e linfa através dos tecidos linfóides num estado relativamente quiescente, até que sejam estimulados a se proliferarem durante uma infecção bacteriana ou viral por exemplo (NEWSHOLME *et al.*, 1999). Entender o sistema imunitário, além de ser importante para a recuperação de infecções também pode ajudar a explicar as condições patológicas, como Diabetes Mellitus tipo I, que são chamadas de doenças autoimune.

Nos anos 80 houve um grande avanço no entendimento do metabolismo das células do sistema imunitário. Até então, estes estudos eram escassos e hoje já somos capazes de responder à questões como, quais são os substratos utilizados por estas células? por quais vias são metabolizados? em que quantidade? e qual a sua importância metabólica? Estudos sobre a

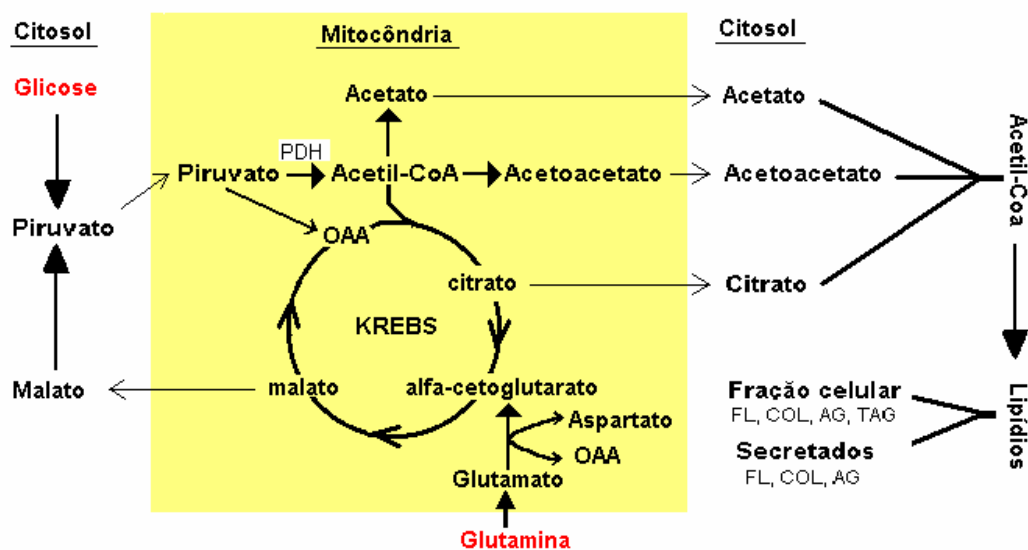
atividade enzimática em linfócitos e macrófagos, demonstraram que estas células possuem alto potencial de utilização da glicose e da glutamina e baixo potencial de utilização de AG e CC (ARDAWI e NEWSHOLME, 1982; NEWSHOLME *et al.*, 1986). Os dados sobre a atividade enzimática indicam apenas a presença da via metabólica, mas não indicam se estes substratos estão realmente sendo utilizados pelas células. Portanto, para determinar a taxa de consumo de substratos e produção de metabólitos, os linfócitos e macrófagos foram incubados por 1 hora na presença dos mesmos. Os resultados mostraram que a glicose e a glutamina são extensivamente utilizadas como substrato, mas não são totalmente oxidadas pelos linfócitos e macrófagos (NEWSHOLME *et al.*, 1999; CURI *et al.*, 1999), mesmo possuindo alta capacidade do ciclo de *Krebs* (CURI *et al.*, 1986). Ou seja, o fornecimento de energia não é a principal importância do metabolismo da glicose e da glutamina nas células do sistema imunitário.

Em tecidos não imunitários o piruvato, proveniente do metabolismo da glicose e da glutamina, é oxidado pelo ciclo de *Krebs* para fornecer energia para estes tecidos. No entanto, nas células do sistema imunitário, o piruvato não segue a via clássica de oxidação pelo ciclo de *Krebs*, mas segue para a via de lipogênese através da formação de acetil-CoA (CURI, NEWSHOLME e NEWSHOLME, 1986 e 1988). O mecanismo pelo qual isso ocorre (Figura 01) é através da descarboxilação do piruvato, promovida pela enzima piruvato desidrogenase (PDH), formando acetil-CoA que, devido ao tamanho da molécula, permanece na mitocôndria. Uma vez que em macrófagos e linfócitos o acetil-CoA não se acumula na mitocôndria e nem é descarboxilado em altas taxas, devem existir mecanismos de transporte para que haja transferência deste metabólito para o citoplasma. Com o objetivo de estudar esses sistemas de transporte, a atividade da acetil-CoA hidrolase que forma acetato, facilmente permeável à membrana mitocondrial, e da ATP-citrato liase, encontrada no citoplasma de linfócitos foram determinadas nessas células (CURI, WILLIAMS e NEWSHOLME, 1989 A e B). Apesar da presença de atividade significativa das duas enzimas, na incubação com mitocôndrias isoladas (obtidas dos linfonodos mesentéricos), a conversão do piruvato em acetato e citrato foi baixa.

Sabe-se que no fígado dos mamíferos, quando há excesso de acetil-CoA, duas dessas moléculas condensam-se formando acetoacetato e 3-hidroxiacetato, os corpos cetônicos. Procurou-se, então, como uma possibilidade adicional, verificar a síntese de corpos cetônicos (CC) no linfócito (CURI, WILLIAMS e NEWSHOLME, 1989 A e B). Inicialmente, a atividade das enzimas relacionadas com a síntese dos CC foi determinada e depois investigou-se a formação destas espécies químicas a partir do piruvato radiomarcado em mitocôndrias

incubadas. Os resultados obtidos são indicativos de que o acetoacetato (50% do total do piruvato consumido) representa, provavelmente, o principal metabólito para a transferência do acetil-CoA da mitocôndria para o citoplasma (CURI *et al.*, 1999).

Uma vez no citoplasma, o acetil-CoA pode ser utilizado para a formação de lipídios (triacilglicerol, fosfolipídio e colesterol), constituindo etapa fundamental no processo de proliferação celular através da constituição de componentes estruturais e duplicação do DNA (CURI, 1999). Este processo é disparado rapidamente e, portanto, para assegurar a eficiência no suprimento da demanda metabólica é mais fácil desviar metabólitos de vias ativas do que estimular uma via metabólica a partir do seu início. Trata-se da “regulação metabólica em ramo” proposta por Crabtree & Newsholme (1985) e que explica o alto fluxo de metabólitos mesmo em células quiescentes (não estimuladas), desde que apresentem potencialidade para proliferação rápida. Assim, é possível que o acetoacetato seja formado e acumulado na célula quiescente e quando o processo de divisão celular é, então, disparado (MARX, 1991 e CLEVENGER, ALTMANN e PRYSTOWSKY, 1991) ocorre o desvio do acetoacetato para a produção de lipídios essenciais ao processo proliferativo.



**FIGURA 01** - Vias de metabolização da glutamina e glicose nos linfócitos e macrófagos até a geração e exportação dos lipídios. Os lipídios formados podem ser incorporados na fração celular ou serem exportados (HOMEM de BITTENCOURT Jr *et al.*, 1993; PERES *et al.*, 1997 e CURI e PERES, 2002).

Os lipídios incorporados em linfócitos e macrófagos cultivados por 24 horas, na presença de piruvato radiomarcado, encontram-se principalmente em: FL, Col e AGL - principalmente ácido araquidônico (HOMEM de BITTENCOURT *et al.*, 1993). Quantidade considerável destes, foi também ativamente exportada para o meio de cultura. O perfil observado para o linfócito foi ligeiramente diferente daquele obtido no macrófago, que não apresenta a capacidade de proliferar-se (CURI & PERES, 2002). Os macrófagos sintetizam muito mais lipídios, a partir de piruvato, do que os linfócitos. Por sua vez, a proporção de lipídios exportada por macrófagos é sete vezes maior do que a quantidade acumulada na célula (HOMEM de BITTENCOURT *et al.*, 1993). Essa capacidade de exportar lipídios mostrou ser bem maior em macrófagos elicitados do que nas células residentes (PERES *et al.*, 1997).

### **Transferência lipídica entre células**

Os AGL da circulação são provenientes da lipólise do tecido adiposo. Entretanto, foi demonstrado que linfócitos e principalmente macrófagos sintetizam lipídios que são acumulados dentro da própria célula, exportados ativamente para o meio e também transferidos para outras células em co-cultura, constituindo um mecanismo de modulação da função do sistema imunitário (HOMEM de BITTENCOURT Jr *et al.*, 1993; HOMEM de BITTENCOURT Jr e CURI, 1998; PERES *et al.*, 1997).

Peres *et al.* (1997) determinaram, inicialmente, o perfil de incorporação dos AG (palmítico, oléico, linoléico e araquidônico), marcados com [ $^{14}\text{C}$ ], pelos macrófagos. Os resultados revelaram que a incorporação é gradativa e atinge seu pico em 6 horas de cultivo, e se deu na seguinte proporção: AA > AO = AL > AP. O perfil de incorporação foi diferenciado em função do tipo de AG utilizado, devido principalmente ao número de insaturações da cadeia carbônica de cada um deles (CURI e PERES, 2002). Em seguida, investigou-se a distribuição da radioatividade nas diferentes frações lipídicas dos macrófagos mostrando que esta se encontra principalmente em FL, TAG e Ecol. Ao entrar nos macrófagos, os AG são rapidamente convertidos em acil-CoA e esterificados nestas frações lipídicas, garantindo um influxo contínuo de AG do sobrenadante para a célula (CURI e PERES, 2002).

Após a determinação do perfil de incorporação dos AG pelos macrófagos e a distribuição da radioatividade nas diferentes frações lipídicas, avaliou-se então a transferência da radioatividade dos macrófagos para os linfócitos em co-cultura (Figura 02). Os resultados



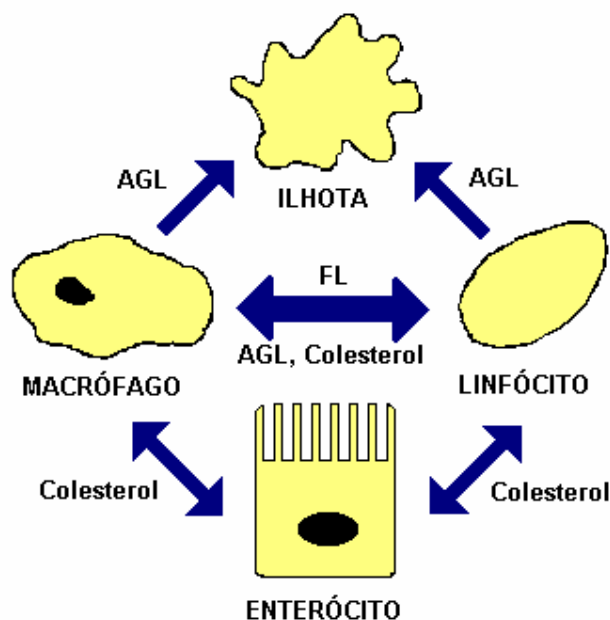
(AA = AO > AL = AP) sugerem que estes AG podem constituir um mecanismo adicional na interação entre macrófagos e linfócitos (PERES *et al.*, 1997).

Depois disso, passou-se a investigar se a espécie lipídica transferida seria somente na forma de AGL. Quando a radioatividade do sobrenadante da co-cultura nos experimentos com o AA radiomarcado (transferido em maior taxa) foi avaliado, observou-se que as frações lipídicas contendo mais [ $^{14}\text{C}$ ] foram AGL > FL > LP (CURI e PERES, 2002). Talvez o AA radiomarcado, incorporado pelos macrófagos, seja transferido para linfócitos através destas espécies químicas.

Das frações lipídicas, tanto de macrófagos quanto de linfócitos, estudadas por Peres *et al.* (1997), a de FL foi a que apresentou maior radioatividade proveniente dos AG. Dentre as diferentes classes estudadas, a FC apresentou mais de 50% do total da radioatividade encontrada nos fosfolipídios destas células, para todos os AG avaliados. Nishiyama-Naruke e Curi (2000) demonstraram que a FC (principalmente quando é rica em AA) exportada pelos macrófagos modulou a proliferação e a produção de citocinas pelos linfócitos aceptores em co-cultura.

Os macrófagos também transferem [4- $^{14}\text{C}$ ]-colesterol em quantidade significativa para linfócitos em co-cultura, em processo dependente de HDL (HOMEM de BITTENCOURT Jr e CURI, 1998). Após as 18 horas de pré-incubação e as 48 horas de co-cultura, a maior parte do colesterol permanece na forma livre, tanto na fração celular quanto no meio. Desta forma, o metabólito transferido de macrófagos para linfócitos, de maneira dependente da lipoproteína, é o colesterol livre (HOMEM de BITTENCOURT Jr e CURI, 1998).

A transferência de lipídios também ocorre de leucócitos para células não leucocitárias (Figura 02). Linfócitos e macrófagos também transferem colesterol para enterócitos e recebem colesterol destas células (PALANCH, 2000). De fato, os enterócitos são células que se renovam constantemente e necessitam de componentes estruturais bem como fontes energéticas. Garcia Jr *et al.* (2001) demonstraram que macrófagos e linfócitos transferem AG marcados com [ $^{14}\text{C}$ ] (palmítico, oléico, linoléico e araquidônico), para as células das ilhotas pancreáticas. Após 3 horas de co-cultivo, a transferência se deu na seguinte proporção: AA >> AO > AL = AP, evidenciando a importância dos macrófagos como fonte de AG (principalmente o AA) para as Ilhotas. O AA é o AG insaturado predominante na fração fosfolipídica das ilhotas, controlando a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas. De acordo com Yeagle (1989), a composição lipídica dos fosfolipídios de membrana podem regular a atividade de proteínas de membrana, canais iônicos e conseqüentemente, a função destas células  $\beta$ .



**FIGURA 02** - Resultados de transferência de lipídios entre células já obtidos até o ano de 2002 (PERES *et al.*, 1997, GARCIA Jr *et al.*, 2001 e CURI e PERES, 2002).

Pardal (2002) investigou pela primeira vez a possibilidade do [ $^{14}\text{C}$ ]-AP ser incorporado pelos linfócitos, exportado para o meio de incubação e transferido para o tecido muscular esquelético co-incubado (Figura 03). Os linfócitos do linfonodo mesentérico de ratos foram cultivados durante 6 horas na presença do [ $^{14}\text{C}$ ]-AP. Em seguida, o músculo sóleo de outros ratos foram retirados e co-incubados por 3 horas na presença dos linfócitos pré-tratados com o AG radiomarcado. Os resultados mostraram que a transferência lipídica também acontece entre linfócitos e o ME, constituindo em aporte adicional de AG além da circulação, principalmente durante o exercício físico (CURI *et al.*, 2001 e 2003).



**FIGURA 03** - Transferência lipídica entre células do sistema imunitário para o tecido muscular esquelético (2002).

### **Possíveis efeitos dos ácidos graxos sobre o músculo esquelético**

Sabe-se que os AG modificam não só a secreção de insulina pelas ilhotas de Langerhans (MASON *et al.*, 1999), como também interferem em ações mediadas por este hormônio, sendo relacionados com o quadro de resistência periférica à insulina (HIRABARA *et al.*, 2003). Porém, o mecanismo pelo qual os AG exercem esta influência ainda permanece desconhecido. O ciclo da glicose-ácido graxo, também conhecido como ciclo de Randle tem sido utilizado para explicar a resistência à insulina (RANDLE *et al.*, 1963). Este, baseia-se na competição entre substratos, onde o aumento da disponibilidade de AG diminui a oxidação de glicose e vice-versa. Contudo, outros trabalhos sugerem que os AG também inibem a captação de glicose estimulada pela insulina ao invés de apenas competir com esta na produção de ATP (BODEN *et al.*, 1994; RODEN *et al.*, 1996; COMBETTES-SOUVERAIN e ISSAD, 1998; DRESNER *et al.*, 1999; LE MARCHAND-BRUSTEL, 1999; LE MARCHAND-BRUSTEL *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2000; SCHMITZ-PEIFLER, 2000). Em estudos com adipócitos incubados demonstrou-se que o palmitato inibe os efeitos da insulina, atuando em sítio pós-receptor (HUNNICUT *et al.*, 1994; HIRABARA *et al.*, 2003). Em miotúbulos pmi28 tratados com palmitato, verificou-se redução na ativação do receptor da insulina, na fosforilação do substrato para o receptor da IRS-1 e na ativação da PKB, resultando em menor captação de glicose por estas células (STORZ *et al.*, 1999). Em estudos com infusão de AG, observou-se redução na fosforilação de IRS-1 e na ativação da PI 3-quinase no ME, resultando na redução da translocação do GLUT-4 à membrana plasmática, na oxidação de glicose e na síntese de glicogênio (DRESNER *et al.*, 1999).

O conteúdo de TAG intramuscular, assim como a composição fosfolipídica da membrana plasmática também tem sido relacionado com a resistência periférica à insulina (RI). Aumento do TAG intramuscular (MANCO *et al.*, 2000 e GOODPASTER e KELLEY, 1998) e/ou AG saturados na membrana plasmática contribuem para o desenvolvimento desta resistência (FOLSOM, MCGOVERN e ECKFELDT, 1996 e VESSBY, 2000).

Por outro lado, os leucócitos podem exercer importante interferência na sinalização insulínica através da transferência de AG para o ME, principalmente em situações nas quais há aumento do fluxo sanguíneo. Isso ocorre, por exemplo, no exercício físico, quando há aumento de 10 a 40 vezes no fluxo sanguíneo no ME (CURI *et al.*, 2003). Nesta circunstância, a transferência de AG de macrófagos e linfócitos para este tecido pode tornar-se significativa e exercer influência na oxidação de metabólitos e na resposta à insulina deste tecido.

## Metabolismo dos ácidos graxos na Diabetes

A *diabetes mellitus* é caracterizada pela diminuição da atividade da insulina sobre os tecidos periféricos, podendo ser classificada em Diabetes tipo I e II. A DM tipo I insulino-dependente (DMID) é a menos comum (10 a 15% dos casos de diabetes na população européia) e pode ser causada por fatores ambientais como certas infecções virais, agentes químicos e nutricionais quando superimpostos aos fatores genéticos, levando à destruição das células  $\beta$  pancreáticas. Através da administração de insulina, a glicemia destes pacientes se normaliza e os CC da circulação voltam aos valores normais, evitando a cetoacidose (ATKINSON e MACLAREN, 1994). Diferentemente, a DM tipo II insulino-independente (DMNID) é mais freqüente que a tipo I e nem sempre necessita da insulina exógena, pois há produção endógena de insulina suficiente para impedir a cetoacidose. Está relacionada tanto a um defeito na ação da insulina nos tecidos periféricos, quanto a uma disfunção na secreção deste hormônio pelo pâncreas (KRUSZYNSKA e OLEFSKY, 1996). A DM tipo II tem sido relacionada à obesidade (60-80% dos casos) e à RI (BODEN, 1996; FUJIMOTO, 2000).

A RI é resultado de um distúrbio na função dos receptores de insulina nas superfícies das células-alvo, impedindo a captação de glicose (MAASSEN & OUWENS, 1997). Alguns estudos têm demonstrado um inter-relacionamento da hiperinsulinemia, obesidade e AGL com a disfunção das células  $\beta$ , RI e o desenvolvimento da DMNID, mas os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente esclarecidos (BODEN *et al.*, 1994; BODEN, 1996; DE FRONZO, 1997; DRESNER *et al.*, 1999; KELLEY *et al.*, 1999; KELLEY e MANDARINO, 2000; YECHOOR *et al.*, 2002; HULVER *et al.*, 2003 ). A observação de que os AGL no sangue representam papel-chave no desenvolvimento da RI em indivíduos obesos com DMNID, foi inicialmente proposto por Randle *et al.* (1963), baseando-se na demonstração do aumento da concentração de AGL e no decréscimo da oxidação de carboidratos em coração de rato incubado e perfundido. Randle *et al.* (1963) propuseram o ciclo glicose-ácido graxo, onde a disponibilidade de AGL no sangue produz aumento do acetil-CoA intramuscular e no conteúdo de citrato, levando à diminuição da utilização da glicose (KELLEY e MANDARINO, 2000). Os trabalhos de Randle estimularam um interesse contínuo na hipótese de que a competição pelo substrato é um mecanismo potencial que contribui para a RI (RANDLE *et al.*, 1963, 1994 e 1998).

Em linfócitos de ratos diabéticos, a taxa de descarboxilação da glutamina e da glicose está reduzida, enquanto que a de AG está aumentada em 100% (OTTON *et al.*, 2002). Os AG exercem papel importante como forma de substituição da baixa atividade enzimática do

metabolismo da glutamina e da glicose, já que existem outras fontes de acetil-CoA. Na diabetes, a concentração de AGL está elevada causando modificações marcantes no metabolismo de linfócitos. Ainda não foram realizados estudos sobre a transferência de lipídios entre células do sistema imunológico e o ME numa situação de diabetes, em que ocorrem profundas modificações no metabolismo energético de ambos os tipos celulares.

## 2 OBJETIVOS

Estudar a transferência de lipídios de linfócitos para o tecido muscular esquelético de rato, visto que alguns autores têm demonstrado que a transferência lipídica entre células pode modular a resposta imunológica, bem como a função da célula ou tecido receptor.

Considerando a importância dos AG como fonte energética e estrutural para vários tipos celulares, este trabalho tem como objetivo investigar a possibilidade de parte dos ácidos [U-<sup>14</sup>C]-palmítico (saturado), [1-<sup>14</sup>C]-oléico (monoinsaturado), [1-<sup>14</sup>C]-linoléico (diinsaturado) e [1-<sup>14</sup>C]-araquidônico (poliinsaturado), sintetizados e exportados pelos linfócitos serem incorporados pelo ME de ratos em situações fisiopatológicas como diabetes. Neste caso o sistema imunitário é ativado e tem participação importante no estabelecimento do estado diabético.

Ao ser transferido para o ME, qual o perfil de incorporação dos diferentes AG? Para isso, será determinada a distribuição da radioatividade, proveniente dos AG, incorporada nas diversas frações lipídicas do músculo esquelético de animais controle e diabéticos.

Verificar a taxa de oxidação dos AG radiomarcados pelos linfócitos de rato normal e diabético.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* machos adultos (3-4 meses, pesando  $225 \pm 25$ g), obtidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (6 animais por gaiola), em sala com temperatura controlada de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob ciclo de iluminação de 12/12 horas, com livre acesso de água e ração contendo 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídios (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR).

Os animais foram distribuídos em dois grupos: 10 animais controle (7 para coleta dos linfócitos e 3 para retirada do músculo sóleo) e 15 animais diabéticos (12 para coleta dos linfócitos e 3 para retirada do músculo sóleo).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Todo o procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal do SCB (Setor de Ciências Biológicas).

#### 3.2 INDUÇÃO DE DIABETES

Após jejum de 12 horas, os animais receberam uma dose de 45 mg/kg de Aloxana (*Sigma-Aldrich*), via peniana, e permaneceram mais 1 hora sem água e ração. Após 48 horas, receberam outra dose de Aloxana, conforme descrito anteriormente. Este procedimento é necessário, pois pelo menos 40% do lote não é induzido ao diabetes com uma única dose da droga.

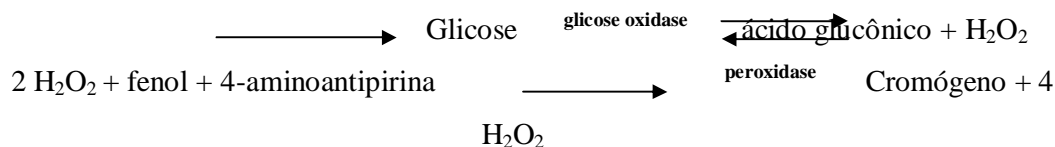
No sexto dia, após jejum de 12 horas, 0,1 mL de sangue foi coletado, pela via caudal, para dosagem da glicemia. Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram glicemia entre 200-350 mg/dL.

Os animais do grupo controle também foram submetidos ao mesmo estresse da injeção peniana, recebendo o mesmo volume de solução salina 0.9%.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA

A dosagem da concentração de glicose no sangue foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando-se o Sistema enzimático Glicose PAP da Labtest. As amostras foram preparadas seguindo as instruções do fabricante.

A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:

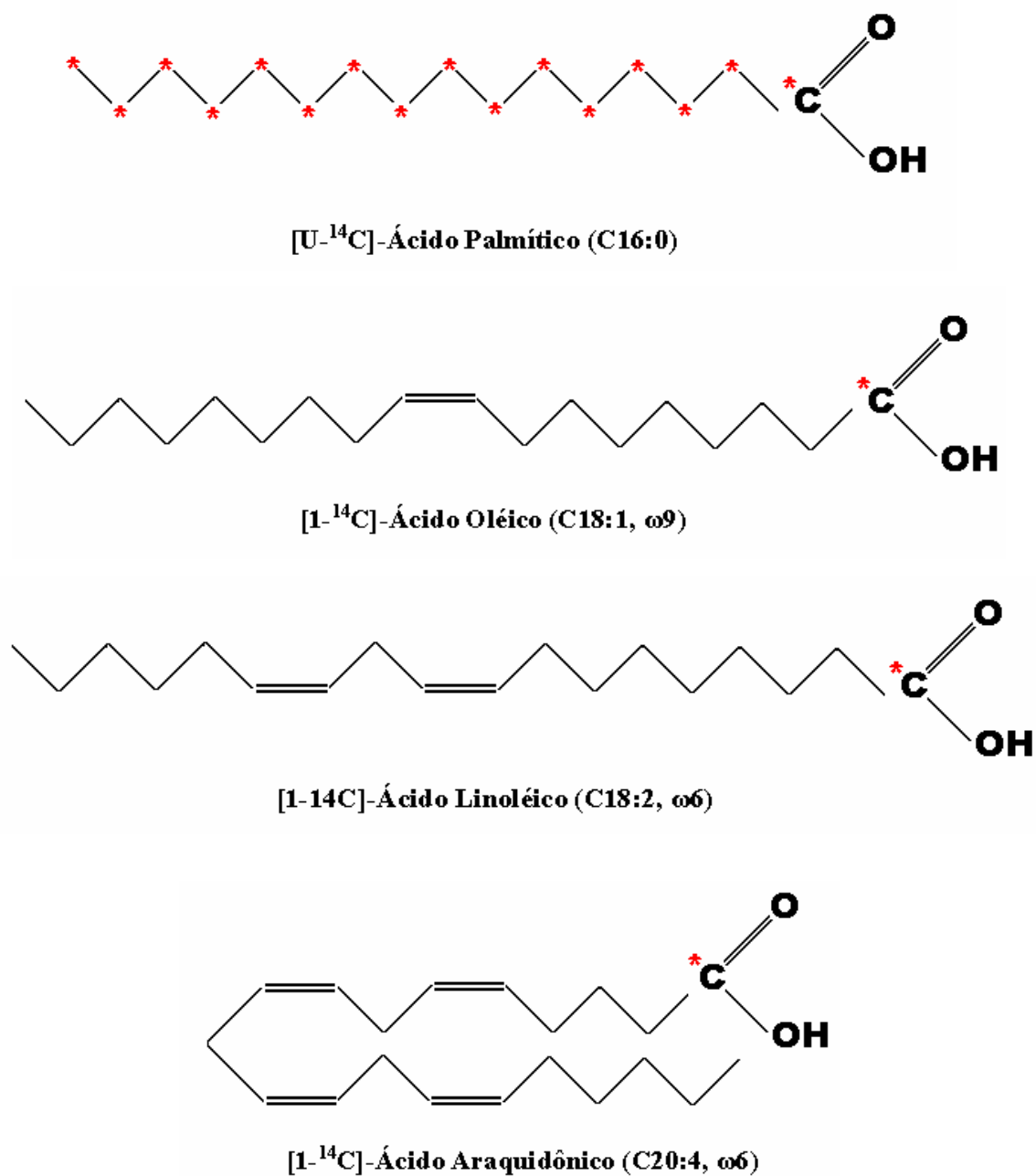


A intensidade de cor emitida é diretamente proporcional à quantidade de glicose na amostra do soro. A leitura de absorvância foi feita no espectrofotômetro Ultrospec 2000 (*Pharmacia*) a 505 nm. A concentração de glicose foi expressa em mg/dL.

### 3.4 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos radiomarcados foram obtidos da *Amersham* (Grã-Bretanha): [U-<sup>14</sup>C]-Ácido Palmítico (C16:0; AE de 824 mCi/mmol; PM: 256,42), [1-<sup>14</sup>C]-Ácido Oléico (C18:1, ω9; AE de 60 mCi/mmol; PM: 282,45), [1-<sup>14</sup>C]-Ácido Linoléico (C18:2, ω6; AE de 58 mCi/mmol; PM: 280,44) e [1-<sup>14</sup>C]-Ácido Araquidônico (C20:4 ω6; AE de 55 mCi/mmol; PM: 304,46).





**FIGURA 04** - Estrutura química dos ácidos graxos radioativos utilizados neste estudo.

\* indica a posição da marcação com [<sup>14</sup>C].

### 3.5 OBTENÇÃO E CONTAGEM DE LINFÓCITOS

Os animais foram mortos por deslocamento cervical e os linfócitos foram obtidos dos linfonodos mesentéricos, por compressão deste órgão num cilindro de malhas. Este é um sistema composto por dois cilindros de aço inox de diferentes diâmetros, de modo que um se encaixe no outro, cujas extremidades de cada um contém um sistema de malha. Este sistema permitiu obtenção de linfócitos íntegros e isolados de gordura.

Os linfócitos foram mergulhados em solução salina (NaCl 0,9%) e submetidos a filtração em papel filtro especial (*Whatman n° 105*, Grã-Bretanha) e em seguida centrifugados (1500 rpm ou 453 g, 4°C), durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em salina (20 mL) e após uma segunda filtração e centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 2 mL de meio de cultura (*Dulbecco's Eagle Medium Gibco*) com BSA a 1% (Sigma EUA). Em seguida, as células foram contadas na câmara de Neubauer, através da exclusão por azul de *Trypan* (*Sigma-Aldrich*).

---

#### Componentes do meio de cultura (DMEM)

---

glicose  
L-glutamina  
110 mg/L piruvato de sódio  
bicarbonato de sódio

---

### 3.6 CULTURA DOS LINFÓCITOS COM AG RADIOMARCADOS

Após a contagem, os linfócitos (pelo menos  $1 \times 10^8$  cels/mL) foram acondicionados em garrafinhas de plástico (*Corning*) contendo 5 mL de meio *Eagle* com BSA a 1% e 0,1  $\mu\text{Ci/mL}$  do AG radiomarcado. As células foram mantidas no banho sob agitação à 37°C, durante 6 horas, tempo a partir do qual a incorporação da radioatividade nas frações lipídicas dos linfócitos não mais se altera (Peres, 1997). Decorrido este período de incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos (1500 rpm ou 453 g, 4°C) e 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi

coletado para a determinação da radioatividade total presente no meio de cultivo, em contador *beta Beckman-LS 6000 IC Liquid Scintillator* (Beckman Instruments, Fullerton, CA, EUA). O sedimentado celular foi lavado com 20 mL de solução salina, submetido a nova centrifugação para eliminar a radioatividade externa, proveniente do sobrenadante. O sedimento celular foi ressuspendido em 2 mL de meio *Krebs-Ringer* (contendo BSA a 1% e glicose 5,6 mM) e levado para contagem de células em câmara de *Neubauer*, através da exclusão por azul de *Trypan*.

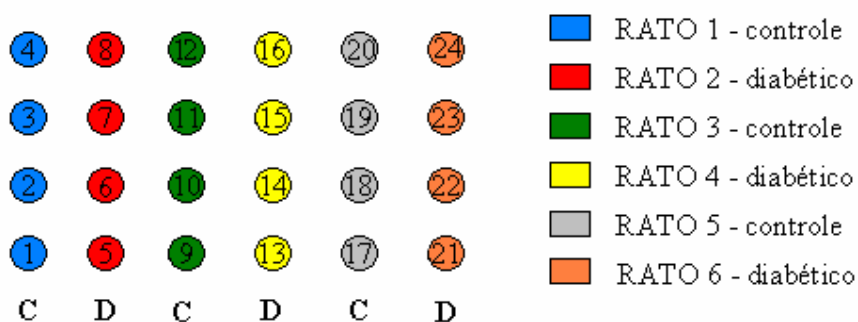
Todos os componentes para a solução de *Krebs-Ringer* e a glicose foram obtidos da Reagen Quimibrás Indústria Brasileira S/A.

Tampão Krebs-Ringer (KR)	
NaCl 0,9% + Hepes 10 mM	150 mL
CaCl <sub>2</sub> 0,11 M	2.25 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,11%	1.5 mL
MgSO <sub>4</sub> 3,82%	1.5 mL
KCl 1,15%	6 mL
NaHCO <sub>3</sub> 1,3%	31.5 mL
pH	7,4

### 3.7 CO-INCUBAÇÃO DE LINFÓCITOS E MÚSCULO ESQUELÉTICO

Após jejum de pelo menos 8 horas, os animais foram mortos por deslocamento cervical e o músculo sóleo das duas patas foi isolado e dividido ao meio com o auxílio de agulha. Em seguida, os músculos foram pesados (máximo 30 mg) e pré-incubados em erlenmeyers, contendo 3 mL do tampão *Krebs-Ringer*, sob constante agitação com atmosfera de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5%) por um período de 30 minutos.

Após o período de pré-incubação, os músculos foram transferidos para outro conjunto de erlenmeyers, contendo 3 mL de meio *Krebs-Ringer* e os linfócitos ( $1 \times 10^7$  céls/mL) incubados anteriormente na presença do AG radiomarcado. O músculo esquelético e os linfócitos foram co-incubados por um período de 3 horas, sob as mesmas condições da pré-incubação.



**FIGURA 05** - Representação da incubação dos músculos do grupo controle e diabético.

Decorrido o período de 3 horas (co-incubação), os músculos foram coletados, lavados em solução salina para retirar o excesso externo de radioatividade, secos e acondicionados em flaconetes contendo 1 mL de líquido de cintilação, para a determinação da radioatividade incorporada em contador *beta Beckman-LS 6000 IC Liquid Scintillator*. Alguns músculos foram congelados em nitrogênio líquido, para posterior extração lipídica. O meio de incubação foi submetido a 5 minutos de centrifugação (1500 rpm ou 453 g, 4°C) para sedimentar os linfócitos, e em seguida, 200µL do sobrenadante foi coletado para determinação da radioatividade no meio, como descrito anteriormente.

### 3.8 EXTRAÇÃO LIPÍDICA

O método utilizado é uma adaptação da metodologia descrita por Folch *et al.* (1957). O princípio desta metodologia está na diferença de solubilidade dos lipídios nos solventes utilizados (água e metanol na fase aquosa e clorofórmio na fase orgânica). Os lipídios são mais solúveis no clorofórmio por possuírem maior coeficiente de partição em solventes orgânicos.

O conteúdo lipídico do músculo esquelético (após 3 horas de co-incubação) foi extraído adicionando-se a cada amostra 0,5 mL de metanol, 1 mL de clorofórmio e 0,5 mL de salina tamponada com sais de fosfato (PBS: NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Em seguida, estas amostras foram homogeneizadas em tubos de fundo chato, agitadas no vórtex e centrifugadas (8000 rpm ou 6797 g, 4°C) por 1 minuto, para que a fase hidrometanólica (superior) fosse

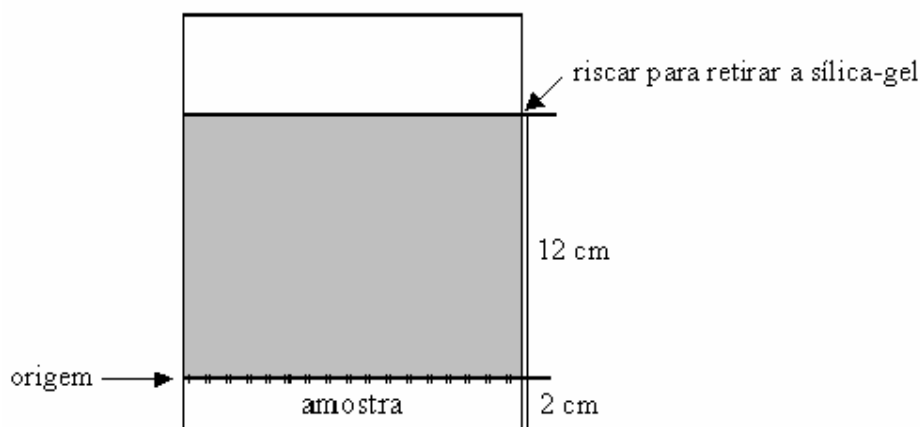
separada da orgânica, e submetidas a nova extração. A fase hidrometanólica foi transferida para tubos Eppendorf® de 2 mL, com adição de 0,4 mL de PBS, 0,5 mL de clorofórmio e 0,5 mL de metanol, enquanto a fase orgânica foi mantida no gelo. Os tubos foram novamente agitados em vórtex e centrifugados para separar nova fase orgânica.

As fases orgânicas, resultante das duas extrações, foram misturadas e reextraídas com 1 mL de solvente de Folch (clorofórmio/metanol/água, 3:48:47, em volume). Cada amostra foi agitada e centrifugada novamente, a fase superior formada (hidrometanólica) desprezada e a fase orgânica, contendo o extrato lipídico, foi seca em *Speed vac (Refrigerated Condensation Trap – SC 110-Savant)* para posterior separação lipídica por cromatografia em camada delgada (*Thin Layer Chromatography*).

### 3.9 CROMATOGRAFIA DOS LIPÍDIOS TOTAIS EM CAMADA DELGADA (*Thin Layer Chromatography*)

Método de separação de mistura baseado na diferença de afinidade dos vários componentes de uma amostra (no caso os lipídios) e entre a mistura de solventes utilizada (fase móvel) com relação a uma substância suporte (fase estacionária), neste caso a sílica-gel aderida à placa de vidro.

As placas utilizadas para a cromatografia foram obtidas da *Sigma-Aldrich* (sílica-gel 60 H com espessura de 250 µm). Antes de aplicar as amostras, as placas foram ativadas por 30 minutos em estufa a 120°C, para retirar o máximo possível da camada de água na superfície da sílica. Após a ativação, as placas foram marcadas com um lápis tomando o cuidado para não retirar a camada de sílica (Fig. 06).



**FIGURA 06** - Representação da placa cromatográfica de sílica-gel com as marcações do local de aplicação das amostras.

As amostras (extratos lipídicos) secas foram lavadas com 2 volumes de 100  $\mu\text{L}$  e 50  $\mu\text{L}$ , respectivamente, da mistura clorofórmio/metanol (2:1, em volume) com 0,05% de hidroxibutil-tolueno (BHT, antioxidante solúvel em solventes orgânicos). Esses volumes foram aplicados à placa cromatográfica com o auxílio de uma seringa (*Hamilton Company, Inc., Whittier, CA, EUA*). Em seguida, a placa foi colocada numa cuba cromatográfica contendo o sistema de solventes (fase móvel), que consiste em hexano/éter dietílico/ácido acético glacial (70:30:1 em volume), e papel filtro ao redor da parede para saturação.

Para a separação dos lipídios totais, as amostras foram cromatografadas à temperatura ambiente, contra padrão *Sigma* (178-1) contendo: colesterol (COL), AG livres (AGL), trioleína (um triacilglicerol, TAG) e um éster de colesterol (ECOL).

Após a corrida cromatográfica de 12 cm, a placa foi retirada da cuba e deixada a temperatura ambiente para secagem e em seguida, revelada com iodo.

As bandas de origem foram raspadas e acondicionadas em flaconetes plásticos (*Wheaton omni-vials-225402*), para radioatividade. Nos flaconetes, foram adicionados 2 mL de líquido de cintilação (*Ecolume®, ICN Biochemicals INC., CA 92626, EUA*). Em seguida, foram agitados e submetidos a decantação durante a noite para posterior contagem em cintilador.

Para a contagem dos brancos, foram utilizadas a sílica presente nas bordas superiores da placa aonde não foram aplicadas amostras.

### 3.10 OXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS PELOS LINFÓCITOS

Em um outro experimento, os linfócitos dos animais controle e diabéticos foram isolados e contados como descrito anteriormente. Em cada erlenmeyer, os linfócitos ( $10^6$  cél./mL) foram incubados com 1 mL do meio *Krebs-Ringer*, contendo 1,5% de BSA e 0,9 mM do Ácido Palmítico não-marcado. Este meio foi anteriormente deixado em banho maria a 37°C sob agitação para complexação do AG com a albumina. Depois de 24 horas, o AP marcado (0,1  $\mu$ Ci/ml) foi adicionado ao meio.

Os linfócitos foram incubados por um período de 1 hora, após este tempo foi adicionado ao meio 200 $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 25% com o auxílio de uma seringa para interromper a reação. Em seguida, no segundo compartimento do erlenmeyer foi adicionado uma mistura de feniletilamina/metanol (1:1 em volume) para captação de [ $^{14}$ CO $_2$ ] produzido pela metabolização do AG. Após mais 1 hora de incubação, a feniletilamina foi coletada e acondicionada em flaconetes contendo líquido de cintilação para a determinação da radioatividade em cintilador.

Para obtenção do branco, às amostras foram injetados 200 $\mu$ L de TCA logo no início da incubação e as células foram mantidas no gelo durante todo o período.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA, *One Way Analysis of Variance*) com pós teste de comparação múltipla de Tuckey, para nível de significância para  $p < 0,05$ .

## 3.12 CÁLCULOS

Abaixo temos exemplo da maneira de se calcular a quantidade de ácido graxo radiomarcado encontrado nos linfócitos e tecido muscular.

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ } \mu\text{Ci} & \text{—————} & 2,22 \times 10^6 \text{ dpm} \\ X & \text{—————} & \text{Amostra dpm} \end{array}$$

$$X = \frac{\text{Amostra}}{2,22 \times 10^6} \mu\text{Ci}$$

Atividade específica do AA:  $51 \mu\text{Ci} \text{ ————— } \mu\text{mol}$

$$\frac{\text{Amostra}}{2,22 \times 10^6} \mu\text{Ci} \text{ ————— } Y$$

$$Y = \frac{\frac{\text{Amostra}}{2,22 \times 10^6}}{51} \mu\text{mol}$$

$$Y = \frac{\text{Amostra}}{113,22 \times 10^6} \mu\text{mol} \div 10^6$$

$$\frac{\text{Amostra}}{113,22 \times 10^6} \text{ pmol}$$



## 4 RESULTADOS

### Incorporação de Ácidos graxos pelos linfócitos

Neste estudo os linfócitos foram cultivados por um período de 6 horas na presença do AA, AL, AO e AP radiomarcados (ver materiais e métodos).

A partir de 0,1  $\mu\text{Ci/mL}$  do AA, AO, AL e AP radiomarcados presentes em 5 mL do meio de cultura, os linfócitos de ratos saudáveis incorporaram cerca de 331, 128, 84 e 18 pmol/ $10^7$  céls, respectivamente. Nos linfócitos de ratos diabéticos a incorporação foi de 126, 89, 81 e 13 pmol/ $10^7$  céls, respectivamente. Na situação patológica, observou-se redução significativa na incorporação dos AG de 62%, 31%, 4% e 28% (Figura 07-10), respectivamente, quando comparada aos LNF de ratos controle.

A incorporação dos AG nos linfócitos, tanto de ratos saudáveis quanto diabéticos, em picomol se deu na seguinte ordem: **AA > AO > AL > AP**.

### Transferência de Ácidos graxos radiomarcados de linfócitos para o musculo

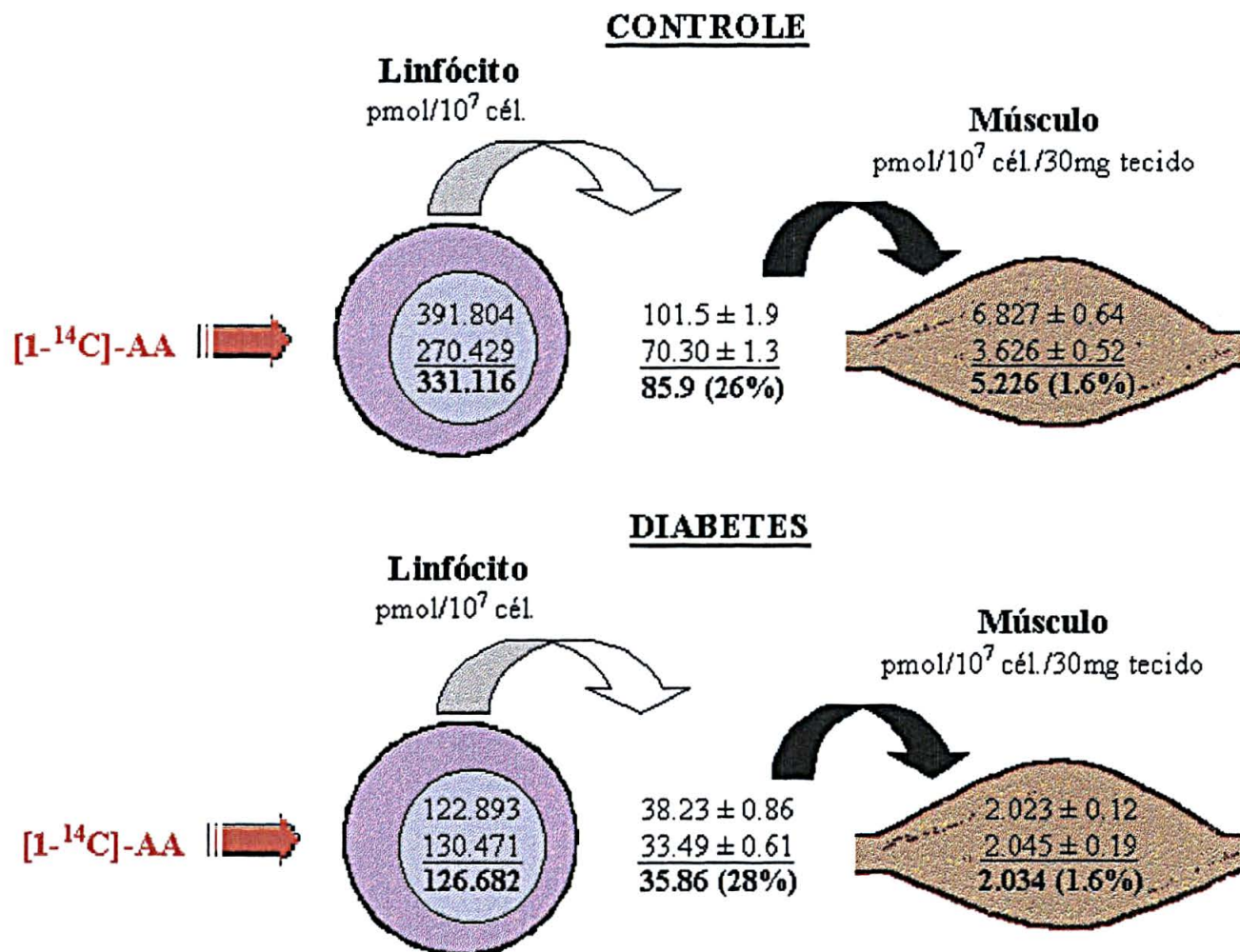
A partir do **AA** incorporado pelos linfócitos de ratos saudáveis (331 pmol/ $10^7$  céls), 85,9 pmol/ $10^7$  céls (26%) foi detectado em 3 mL do meio de incubação e 5,2 pmol/ $10^7$  céls/30mg de tecido (1,6%) foi transferido para o músculo esquelético. A taxa de exportação e transferência do AA incorporado pelos linfócitos de ratos diabéticos não se mostrou alterada em relação a do grupo controle. A partir de 126 pmol/ $10^7$  céls, cerca de 35,86 pmol/ $10^7$  céls (28%) foram detectados em 3 mL do meio de incubação e 2 pmol/ $10^7$  céls/30mg de tecido (1,6%) transferidos para o músculo esquelético (Figura 07).

A partir do **AO** incorporado pelos linfócitos de ratos saudáveis (128 pmol/ $10^7$  céls) 32,6 pmol/ $10^7$  céls (25%) foi encontrado em 3 mL do meio de incubação e 1,27 pmol/ $10^7$  céls/30mg de tecido (1%) transferido para o músculo esquelético. A taxa de exportação e transferência do AO incorporado pelos linfócitos de ratos diabéticos também não se mostrou alterada em relação a do grupo controle. A partir de 89 pmol/ $10^7$  céls, cerca de 28 pmol/ $10^7$  céls (31%) foram encontrados em 3 mL do meio de incubação e 1 pmol/ $10^7$  céls/30mg de tecido (1,2%) foram transferidos para o músculo esquelético (Figura 08).

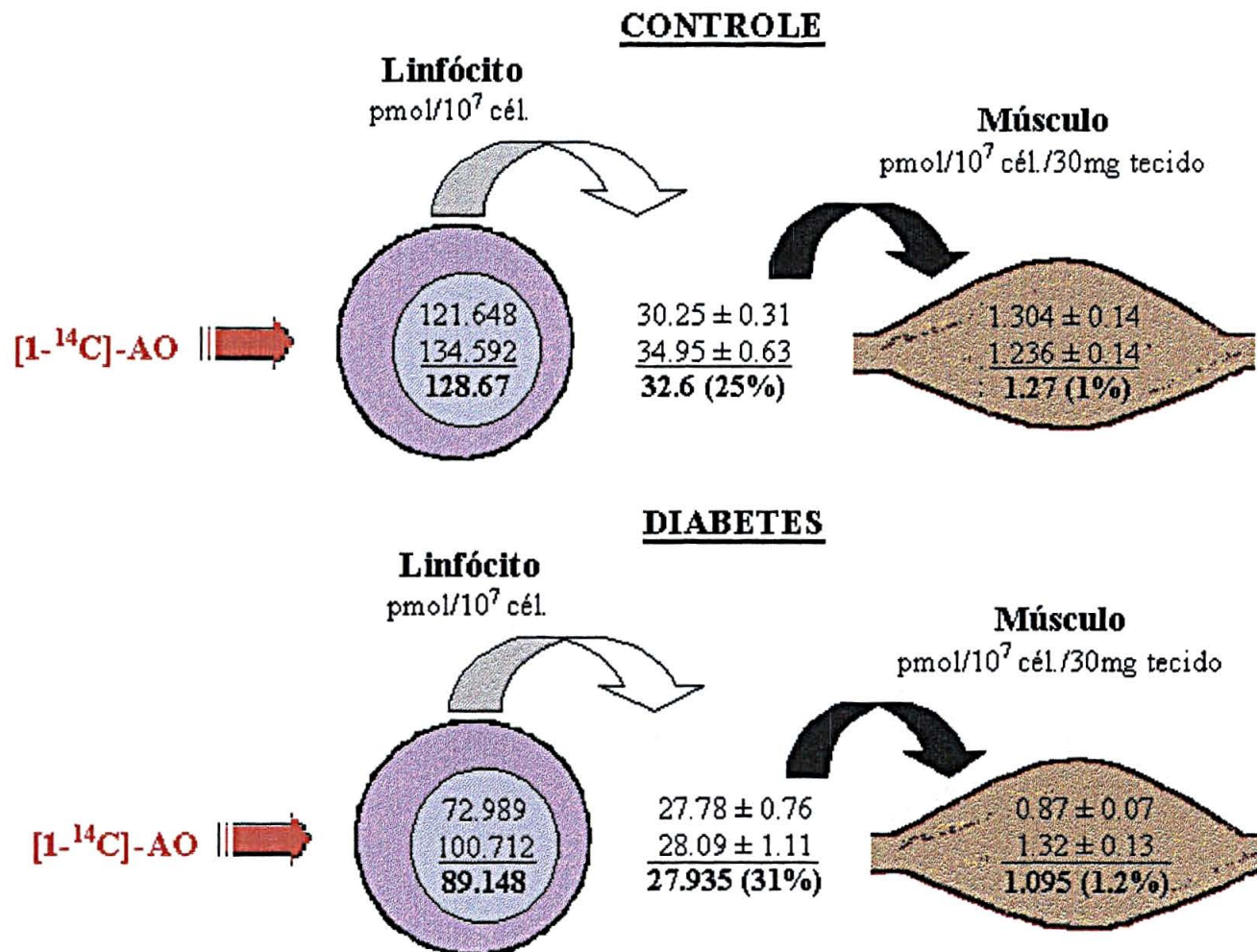
A partir do **AL** incorporado pelos linfócitos de ratos saudáveis ( $84 \text{ pmol}/10^7 \text{ céls}$ )  $36,22 \text{ pmol}/10^7 \text{ céls}$  (43%) foi encontrado em 3 mL do meio de incubação e  $0,96 \text{ pmol}/10^7 \text{ céls}/30 \text{ mg}$  de tecido (1,1%) foi transferido para o músculo esquelético. A taxa de exportação e transferência do AL incorporado pelos linfócitos de ratos diabéticos também não se mostrou alterada em relação a do grupo controle. A partir de  $81,298 \text{ pmol}/10^7 \text{ céls}$  contidos nos linfócitos de ratos diabéticos,  $36,08 \text{ pmol}/10^7 \text{ céls}$  (44%) foram encontrados em 3 mL do meio de incubação e  $1 \text{ pmol}/10^7 \text{ céls}/30 \text{ mg}$  de tecido (1,5%) transferidos para o músculo esquelético (Figura 09).

A partir do **AP** incorporado pelos linfócitos de ratos saudáveis ( $18 \text{ pmol}/10^7 \text{ céls}$ )  $6,7 \text{ pmol}/10^7 \text{ céls}$  (36%) foi encontrado em 3 mL do meio de incubação e  $0,315 \text{ pmol}/10^7 \text{ céls}/30 \text{ mg}$  de tecido (1,7%) transferido para o músculo esquelético. A taxa de exportação e transferência do AP incorporado pelos linfócitos de ratos diabéticos não se mostrou alterada em relação a do grupo controle. A partir de  $13 \text{ pmol}/10^7 \text{ céls}$  presente nos linfócitos de ratos diabéticos  $4,14 \text{ pmol}/10^7 \text{ céls}$  (31%) foram encontrados em 3 mL do meio de incubação e  $0,24 \text{ pmol}/10^7 \text{ céls}/30 \text{ mg}$  de tecido (1,8%) transferidos para o músculo esquelético (Figura 10).

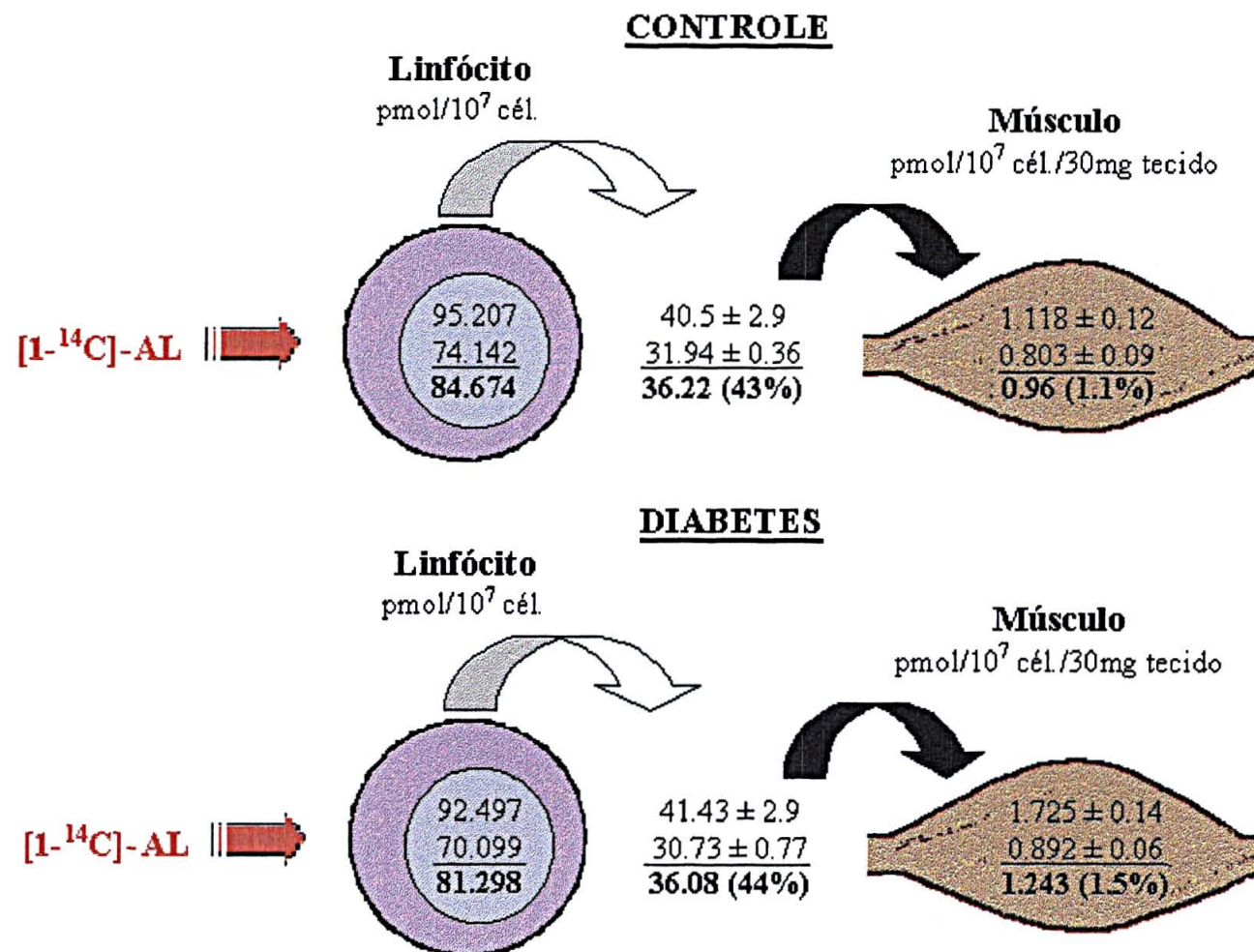
A taxa em picomol de transferência dos AG dos linfócitos para a musculatura esquelética, tanto de ratos saudáveis quanto diabéticos, se deu na seguinte ordem: **AA > AO = AL > AP**.



**FIGURA 07** - Taxa de incorporação do Ácido [1-<sup>14</sup>C]-Araquidônico (0,1 µCi/mL) pelos linfócitos de ratos normais e diabéticos, após 6h de cultura. Taxa de exportação para o meio e transferência para o músculo sóleo (30 mg) de ratos normais e diabéticos, após 3h de co-incubação (3 mL). Os resultados representam a média ± epm, de 2 experimentos em quadruplicata .

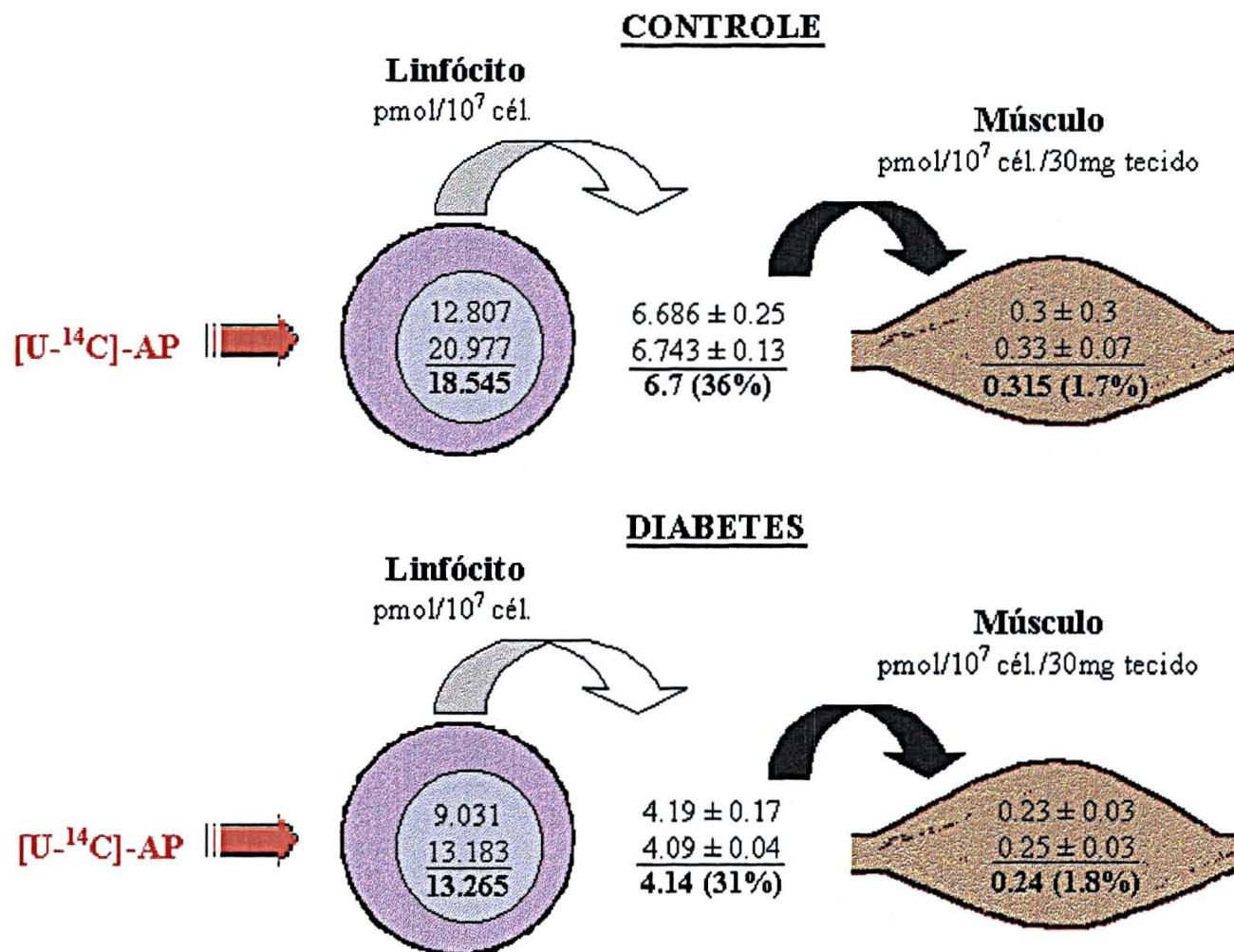


**FIGURA 08** - Taxa de incorporação do Ácido [1-<sup>14</sup>C]-Oléico (0,1 µCi/mL) pelos linfócitos de ratos normais e diabéticos, após 6h de cultura. Taxa de exportação para o meio e transferência para o músculo sóleo (30 mg) de ratos normais e diabéticos, após 3h de co-incubação (3 mL). Os resultados representam a média ± epm, de 2 experimentos em quadruplicata.



**FIGURA 09** - Taxa de incorporação do Ácido [1-<sup>14</sup>C]-Linoléico (0,1 µCi/mL) pelos linfócitos de ratos normais e diabéticos, após 6h de cultura. Taxa de exportação para o meio e transferência para o músculo sóleo (30 mg) de ratos normais e diabéticos, após 3h de co-incubação (3 mL). Os resultados representam a média ± epm, de 2 experimentos em quadruplicata.





**FIGURA 10** - Taxa de incorporação do Ácido [U-<sup>14</sup>C]-Palmitico (0,1 µCi/mL) pelos linfócitos de ratos normais e diabéticos, após 6h de cultura. Taxa de exportação para o meio e transferência para o músculo sóleo (30 mg) de ratos normais e diabéticos, após 3h de co-incubação (3 mL). Os resultados representam a média ± epm, de 2 experimentos em quadruplicata.

### **Incorporação dos ácidos graxos em diferentes frações lipídicas do músculo esquelético**

As tabelas 1-4 apresentam os dados da radioatividade incorporada no ME a partir dos AG nas diferentes frações lipídicas - fosfolipídios (FL), lipídios polares (LP, fração lipídica compreendida entre os FL e o Col, representadas por mono- e diacilglicerol), colesterol (Col), ácidos graxos livres (AGL), triacilglicerol (TAG) e éster de colesterol (Ecol) do músculo sóleo de ratos saudáveis e diabéticos.

Do **AA** transferido para o músculo de rato saudável, 4,5% foi incorporado na fração de Ecol, 11,6% na de TAG, 4,7% na de AGL, 9,5% na de Col, 10,3% na de LP e a maior parte, 59,4% na de FL. No rato diabético, 7,9% na de Ecol, 18,3% na de TAG, 7,9% na de AGL, 14,4% na de Col, 15,8% na de LP e 35,6% na de FL.

Do **AO** transferido para o músculo de rato saudável, 6% foi incorporado na fração de Ecol, 14% na de TAG, 8,4% na de AGL, 12,5% na de Col, 13,2% na de LP e a maior parte, 45,8% na de FL. No rato diabético, 6% na de Ecol, 11,5% na de TAG, 6,7% na de AGL, 10,4% na de Col, 11,5% na de LP e 53,9% na de FL.

Do **AL** transferido para o músculo de rato saudável, 6,9% foi incorporado na fração de Ecol, 9,9% na de TAG, 4,8% na de AGL, 8,7% na de Col, 6,9% de LP e a maior parte, 62,8% na de FL. No rato diabético, 9,3% na fração de Ecol, 16,9% na de TAG, 10,2% na de AGL, 13,9% na de Col, 11,8% na de LP e 37,8% na de FL.

Do **AP** transferido para o músculo de rato saudável, 2,5% foi incorporado na fração de Ecol, 7,2% na de TAG, 2,9% na de AGL, 6,6% na de Col, 5,7% na de LP e a maior parte, 75% na de FL. No rato diabético, 1,6% na de Ecol, 6,8% na de TAG, 1,8% na de AGL, 7,6% na de Col, 6,6% na de LP e 75,6% na de FL.

Ác. Araquidônico	CONTROLE		DIABETES	
	pmol/g tec.	%	pmol/g tec.	%
Ecol	2,776	4,5	2,914	7,9
TAG	7,066	11,6	6,738	18,3
AGL	2,860	4,7	2,914	7,9
Col	5,804	9,5	5,281	14,4
LP	6,309	10,3	5,827	15,8
FL	36,255	59,4	13,112	35,6

**TABELA 01** - Distribuição do Ácido [1-<sup>14</sup>C]-Araquidônico (pmol/g tec. e %) nas diferentes frações lipídicas do músculo esquelético co-incubado com linfócitos obtidos de ratos normais e diabéticos. Os resultados em pmol/g tecido representam a média de 2 experimento em quadruplicata.  
Ecol - ester de colesterol; TAG - Triacilglicerol; AGL - ácidos graxos livres; Col - colesterol; LP - lipídios polares; FL - fosfolipídios.



Ac. Oléico	CONTROLE		DIABETES	
	pmol/g tec.	%	pmol/g tec.	%
Ecol	1,971	6,0	1,444	6,0
TAG	4,653	14,1	2,764	11,5
AGL	2,760	8,4	1,609	6,7
Col	4,101	12,5	2,516	10,4
LP	4,337	13,2	2,764	11,5
FL	15,062	45,8	12,994	53,9

**TABELA 02** - Distribuição do Ácido [1-<sup>14</sup>C]-Oléico (pmol/g tec. e %) nas diferentes frações lipídicas do músculo esquelético co-incubado com linfócitos obtidos de ratos normais e diabéticos. Os resultados em pmol/g tecido representam a média de 2 experimento em quadruplicata. Ecol - ester de colesterol; TAG - Triacilglicerol; AGL - ácidos graxos livres; Col - colesterol; LP - lipídios polares; FL - fosfolípidios.

Ac. Linoléico	CONTROLE		DIABETES	
	pmol/g tec.	%	pmol/g tec.	%
Ecol	1,621	6,9	2,137	9,3
TAG	2,347	9,9	3,857	16,9
AGL	1,152	4,8	2,345	10,2
Col	2,048	8,7	3,179	13,9
LP	1,621	6,9	2,710	11,8
FL	14,850	62,8	8,652	37,8

**TABELA 03** - Distribuição do Ácido [1-<sup>14</sup>C]-Linoléico (pmol/g tec. e %) nas diferentes frações lipídicas do músculo esquelético co-incubado com linfócitos obtidos de ratos normais e diabéticos. Os resultados em pmol/g tecido representam a média de 2 experimento em quadruplicata. Ecol - ester de colesterol; TAG - Triacilglicerol; AGL - ácidos graxos livres; Col - colesterol; LP - lipídios polares; FL - fosfolipídios.

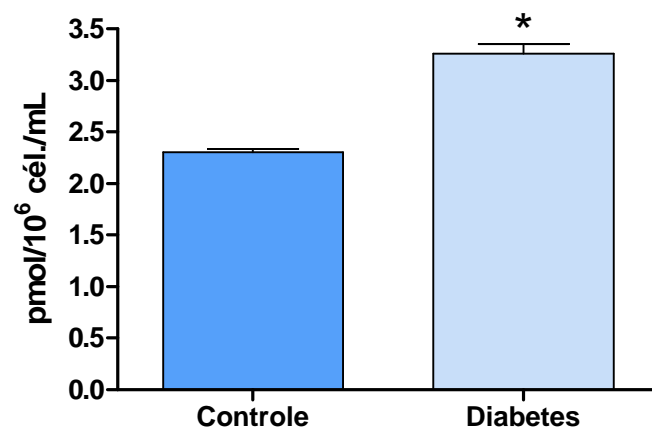
Ac. Palmítico	CONTROLE		DIABETES	
	pmol/g tec.	%	pmol/g tec.	%
Ecol	0,085	2,5	0,107	1,6
TAG	0,247	7,2	0,444	6,8
AGL	0,099	2,9	0,120	1,8
Col	0,227	6,6	0,489	7,6
LP	0,193	5,7	0,430	6,6
FL	2,567	75,1	4,938	75,6

**TABELA 04** - Distribuição do Ácido [U-<sup>14</sup>C]-Palmítico (pmol/g tec. e %) nas frações diferentes lipídicas do músculo esquelético co-incubado com linfócitos obtidos de ratos normais e diabéticos. Os resultados em pmol/g tecido representam a média de 2 experimento em quadruplicata.

Ecol - ester de colesterol; TAG - Triacilglicerol; AGL - ácidos graxos livres; Col - colesterol; LP - lipídios polares; FL - fosfolipídios.

**Taxa de descarboxilação do ácido palmítico pelos linfócitos**

Após 1 hora de incubação, a taxa de descarboxilação do **AP** pelos linfócitos de ratos saudáveis foi de 2,306 pmol/10<sup>7</sup> céls, enquanto que a taxa de descarboxilação pelos linfócitos de ratos diabéticos foi de 3,261 pmol/10<sup>7</sup> céls. Houve um aumento de 29% na taxa de descarboxilação do AP pelos linfócitos de ratos diabéticos quando comparado com os linfócitos de ratos saudáveis (Figura 11).



**FIGURA 11** - Taxa de descarboxilação do Ácido Palmítico pelos linfócitos obtidos de ratos normais e diabéticos, após 1h. Os dados representam a média  $\pm$  epm de 2 experimentos em quintuplicata. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.

## 5 DISCUSSÃO

Linfócitos e macrófagos utilizam ativamente glicose e glutamina mas oxidam parcialmente estes substratos (ARDAWI e NEWSHOLME, 1982; CURI, NEWSHOLME e NEWSHOLME, 1986 e 1988; NEWSHOLME *et al.*, 1986). O piruvato, produto da metabolização da glicose e da glutamina, não é essencialmente oxidado pelo ciclo de Krebs e sim desviado para síntese de lipídios, via formação de acetil-CoA (CURI *et al.*, 1999; NEWSHOLME *et al.*, 1999). Estes lipídios são armazenados na própria célula e também são ativamente exportados para o meio de incubação (HOMEM de BITTENCOURT Jr *et al.*, 1993). Além de sintetizar e exportar lipídios ativamente, linfócitos e macrófagos transferem estes lipídios entre si constituindo um mecanismo de sinalização entre células do sistema imunitário, podendo atuar como citocinas e autacóides (PERES *et al.*, 1997 e NISHIYAMA-NARUKE e CURI, 2000; CURI *et al.*, 2001). Em adição, as células leucocitárias também transferem lipídios para outros tecidos tais como enterócitos (PALANCH, 2000) e ilhotas de Langerhans (GARCIA Jr, 2000 e GARCIA Jr *et al.* 2001). Em experimentos *in vivo* verificou-se que macrófagos também são capazes de transferir [<sup>14</sup>C]-AA para a glândula adrenal, fígado, baço e aorta (CURI e PERES, 2002). Nosso grupo mostrou, pela primeira vez na literatura, que a transferência lipídica também ocorria entre células do sistema imunitário, no caso os linfócitos, e a musculatura esquelética, o que poderia constituir em fonte adicional de AG, principalmente em situações de exercício físico (CURI *et al.*, 2001 e 2003). Entretanto, não há nenhum trabalho que tenha investigado este fenômeno de transferência lipídica entre linfócitos e o músculo esquelético no estado patológico de diabetes, bem como o perfil de incorporação de lipídios neste tecido.

A Diabetes Mellitus do tipo I e tipo II são caracterizadas por diminuição da atividade da insulina sobre os tecidos periféricos. A etiologia da doença ocorre por deficiência na secreção do hormônio devido a destruição autoimune das células  $\beta$ -pancreáticas ou por uma combinação de resistência periférica à insulina (RI) e secreção alterada do hormônio. Essa ação diminuída da insulina leva a alterações profundas na função das células e/ou tecidos insulino-dependentes (músculo ou tecido adiposo), causando mudanças no metabolismo de glicose e lipídios, na expressão dos genes e fosforilação de proteínas, que culminam nas manifestações clínicas e complicações desta doença (YECHOOR *et al.*, 2002). Sabe-se também que em modelos de animais diabéticos, assim como em pacientes com DM do tipo I, há taxas elevadas de lipólise, altos níveis de AGL, corpos cetônicos, TAG e colesterol no

plasma e hiperglicemia ocasionados pela diminuição do metabolismo da glicose (RANDLE, 1986; KELLEY e MANDARINO, 2000).

O modelo utilizado neste estudo foi o de DM tipo I onde todas as alterações metabólicas são desencadeadas pela falta da insulina. Neste modelo de diabetes não se desenvolve RI nos sete dias de estabelecimento do quadro patológico.

O músculo esquelético é o local de maior utilização de glicose, sinalizado pela insulina e, também, o local de maior RI. Em razão do estado de diabetes tipo I, o tecido muscular necessita de substrato energético alternativo, no caso os AG, que são disponibilizados em grande quantidade na circulação a partir do tecido adiposo. A fonte energética predominante para o músculo esquelético, em repouso, é a oxidação dos AG. O metabolismo de glicose e corpos cetônicos também contribuem, dependendo da atividade e do estado metabólico do músculo (FRAYN, 2003). Entretanto, na diabetes, há diminuição na contribuição da glicose para o metabolismo energético e aumento da oxidação dos AG (RANDLE *et al.*, 1963, 1994 e 1998; ENRIQUEZ, 2002 e FRAYN, 2003).

No exercício físico de longa duração, é importante que a utilização do TAG e AG seja a maior possível para poupar a utilização da reserva de glicogênio muscular e a glicose plasmática (CURI, 2003). A hipótese que parece melhor explicar esse “desvio” do metabolismo da glicose para os lipídios é a do ciclo glicose-ácido graxo que se baseia na competição entre dois substratos, onde o aumento da disponibilidade dos AG compete com a glicose pela oxidação (RANDLE *et al.*, 1963). Baseados neste achado, Randle *et al.* (1963) propuseram o ciclo da glicose-ácido graxo ou também chamado de ciclo de Randle para tentar explicar a RI em pacientes diabéticos e obesos (RANDLE *et al.* 1994 e 1998). O aumento na oxidação de AGL leva a aumento da concentração de acetil-CoA intramitocondrial e diminuição na razão NADH/NAD<sup>+</sup>, resultando na inativação da enzima piruvato desidrogenase. Conseqüentemente, o aumento de citrato intracelular inibe a enzima fosfofrutoquinase, provocando aumento da concentração de glicose-6-fosfato. O aumento deste metabólito inibe a hexoquinase e leva a diminuição da captação de glicose por diferença de concentração do substrato dentro e fora da célula.

Doenças caracterizadas por aumento da concentração plasmática de AGL como Diabetes Mellitus (REAVEN *et al.*, 1988) e cancer (BROWN *et al.*, 1983) são frequentemente associados com alterações na função imunitária (MOUTSCHEN, SCHEEN e LEFEBVRE, 1992). Além disso, hiperglicemia e falta da insulina provocam alterações metabólicas nos linfócitos de animais diabéticos. Inúmeros estudos têm demonstrado a ocorrência de alterações nos linfócitos de humanos e animais diabéticos expostos a esses altos níveis de

AGL (HEROLD *et al.*, 1984; FAUSTMAN *et al.*, 1989; KAABA e AL-HARBI, 1995; STULNIG *et al.*, 2000; KÄNEL, MILLS e DIMSDALE, 2001; OTTON *et al.*, 2002 e OTTON e CURI, 2002; OTTON, MENDONÇA e CURI, 2002). Os linfócitos utilizam glicose e glutamina ativamente como substrato metabólico, no entanto, no estado diabético há diminuição na captação e utilização de ambas as fontes energéticas. Otton *et al.* (2002) investigaram as alterações metabólicas que ocorriam nos linfócitos numa situação de diabetes induzido por Aloxana. Esses autores mostraram que há diminuição na descarboxilação da glicose (30%) e glutamina (33%) e em contrapartida, há aumento significativo na descarboxilação do AP (100%). Estes resultados sugerem que há substituição das fontes energéticas numa condição patológica como a diabetes. As enzimas da via glicolítica estão inibidas, contribuindo para a diminuição da utilização da glicose. Após tratamento com insulina, a descarboxilação da glicose bem como a atividade de algumas enzimas (hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase e citrato sintase) aumentaram (OTTON, 2001; OTTON *et al.*, 2002; OTTON e CURI, 2002).

Linfócitos cultivados por um período de 6 horas na presença de AG radiomarcado, como previamente demonstrado por Peres *et al.* (1997), tiveram a incorporação do AA, AO, AL e AP pelos linfócitos, tanto de ratos saudáveis quanto de ratos diabéticos, na seguinte ordem: AA > AO > AL > AP. Os linfócitos do grupo diabético apresentaram redução na taxa de incorporação da radioatividade proveniente do AA, AO, AL e [ $C^{14}$ ]-AP de 62%, 31%, 4% e 28%, respectivamente (Figuras 07-10). Entretanto, nestas mesmas células, a taxa de descarboxilação do AP, durante um período de 1 hora, aumentou em 29% (Figura 11). Nos estudos de Otton *et al.* (2002) a taxa de descarboxilação do AP, realizada num período de 6 horas (tempo utilizado no cultivo dos linfócitos na presença do AG radiomarcado), apresentou aumento de 100% nesta taxa. Nossos resultados mostram que mesmo num período menor, já foi possível observar aumento significativo da taxa de descarboxilação do AP pelos linfócitos de ratos diabéticos.

Outros estudos de transferência lipídica também mostraram o mesmo perfil de distribuição dos AA, AO, AL e [ $C^{14}$ ]-AP pelas células do sistema imunitário (macrófagos e linfócitos). Nos estudos de Peres *et al.* (1997), realizado com macrófagos e linfócitos residentes e elicitados, o AA (20:4 n-6) também foi o mais incorporado (AA > AO = AL > AP) e a taxa de transferência para os linfócitos não estimulados ocorreu da seguinte forma: AA = AO > AL = AP. A maior parte da radioatividade proveniente dos [ $C^{14}$ ]-AG foi incorporada na fração fosfolipídica mostrando que ao entrar nos macrófagos, os AG são convertidos em acil-CoA e esterificados principalmente nesta fração lipídica garantindo o



influxo contínuo de AG do meio para o interior das células. Na presença de estímulo (zimosan), observou-se aumento da incorporação de todos os AG utilizados no estudo (PERES *et al.*, 1997). Após 3 horas de co-cultura, macrófagos também transferem AG para as ilhotas pancreáticas da seguinte forma: AA >> AO > AL = AP (GARCIA Jr *et al.*, 2001). Da mesma maneira, a maior parte da radioatividade proveniente dos [ $^{14}\text{C}$ ]-AG transferida foram incorporadas na fração fosfolipídica.

Além das modificações que ocorrem no metabolismo dos linfócitos de animais diabéticos, pode ocorrer diminuição da captação de AG ou seja, alterações nos mecanismos de transporte do AG através da membrana plasmática. Os AG são transportados no plasma ligados à albumina e a translocação através da membrana celular é mediada por proteínas transportadoras de AG (FABPs) (McARTHUR *et al.*, 1999; STORCH e THUMSER, 2000). Os AG também atravessam a membrana celular por difusão simples, sendo a taxa de transferência dependente do estado metabólico da célula (HAMILTON e KAMP, 1999). Os AG de cadeia longa são importantes para as células atuando de diferentes formas como fonte energética, constituição de membrana (FL) e armazenamento de energia (TAG e Ecol). Estudos recentes têm mostrado que os AG de cadeia longa e seus metabólitos direta ou indiretamente regulam a atividade de muitas enzimas, receptores de membrana, canais iônicos, diferenciação celular, desenvolvimento celular e expressão de genes (GLATZ *et al.*, 1995; McARTHUR *et al.*, 1999).

Já é bem conhecido que indivíduos diabéticos têm maior suscetibilidade à infecções, quando comparados a indivíduos saudáveis. Quanto aos efeitos dos AG sobre as funções dos linfócitos, inúmeros trabalhos têm mostrado que dietas ricas em gordura resultam em redução das funções linfocitárias comparadas a dietas pobres em gordura (CALDER, 1995). A ordem de potência de inibição é gordura saturada < óleos ricos em PUFA n-6 < óleo de oliva < óleo de linhaça < óleo de peixe (CALDER, 1996 A e B). Contudo, a extensão de inibição mencionada por vários estudos, usando o mesmo tipo de óleo, é variável. Baixas concentrações de ácidos graxos (menor que 5  $\mu\text{M}$ ) estimulam a proliferação de linfócitos enquanto que concentrações mais elevadas (10-15  $\mu\text{M}$ ) inibem (KELLY e PARKER, 1979). A maioria dos estudos concorda que a extensão da inibição da proliferação de linfócitos depende do grau de insaturação e do comprimento da cadeia dos ácidos graxos. Quanto maior a cadeia carbônica e o número de insaturações, maior a inibição (CALDER, 1996 A e B).

Neste estudo investigou-se a transferência lipídica de linfócitos para a musculatura esquelética, através da co-incubação de linfócitos, previamente cultivados na presença do AG radiomarcado, com o músculo sóleo de ratos saudáveis e diabéticos, por um período de 3

horas. Embora os linfócitos de ratos diabéticos tenham apresentado menor taxa de incorporação, determinada pela radioatividade proveniente dos  $[C^{14}]$ -AG, a taxa de transferência destas células para o músculo não se modificou quando comparada à do controle. No músculo de ratos saudáveis e de diabéticos encontramos como resultado da transferência 1,6 % a partir do AA para ambos, 1,27% e 1,2% a partir do AO, 1,1% e 1,5% a partir do AL e 1,7% e 1,8% a partir do AP, respectivamente.

O AP é produto da síntese de AG que pode ser dessaturado ou alongado por processos enzimáticos separados dando origem aos AG saturados e insaturados de cadeia longa. Estudo realizado em músculo sóleo incubado com AP mostrou que, em quantidades fisiológicas, ele diminuiu a fosforilação da IRS-1/2, Akt e p 44/42 MAP quinase estimuladas pela insulina, diminuiu o fluxo glicolítico, mas aumentou a síntese de glicogênio no músculo esquelético através de mecanismos que requerem a sua metabolização (HIRABARA *et al.*, 2003). Entretanto, estes autores sugerem que em condições patológicas, onde há exposição crônica aos altos níveis de AGL como na diabetes, este poderia estar envolvido com a RI.

Estudos realizados com modelo animal de diabetes induzido por estreptozotocina demonstraram aumento na expressão de várias proteínas envolvidas na utilização e oxidação de AG no músculo (YECHOOR *et al.*, 2002). Houve aumento do RNAm do transportador 1 de AG, que regula a passagem de AG de cadeia longa através da membrana plasmática, do RNAm da lipase hormônio-sensível, que contribui para o aumento do AG não esterificado no citosol e do RNAm da proteína ligante 3 de AG, proteína transportadora intracelular de AG de cadeia longa. Além disso, a transcrição de todas as enzimas envolvidas na  $\beta$ -oxidação (acetil-CoA desidrogenase, enoil-CoA hidratase,  $\beta$ -cetoacil-tiolase,  $\Delta^2$ ,  $\Delta^3$ -enoil-CoA isomerase e dodecenoil-CoA- $\Delta$ -isomerase) encontravam-se aumentadas na diabetes (YECHOOR *et al.*, 2002). Portanto, a diabetes induzida por streptozotocina caracteriza-se por aumento de AGL, aumento da oxidação e diminuição da síntese de AG no músculo esquelético (YECHOOR *et al.*, 2002). Pardal (2002) também mostrou que a musculatura esquelética dos animais diabéticos, induzidos por aloxana, incorporaram mais AG (AA, AO, AL e AP) quando comparada à do grupo controle. Entretanto, em seu trabalho foi utilizado linfócitos de ratos saudáveis, em que a quantidade de radioatividade exportada para o meio foi a mesma para os músculos co-incubados de ratos controle e diabetizados. Esta abordagem é diferente da nossa, pois o próprio grupo fornecia seus linfócitos.

Uma vez que os quatro tipos de AG utilizados neste estudo são ativamente incorporados por linfócitos e transferidos para a musculatura esquelética, investigamos como estes AG se distribuem nas diferentes frações lipídicas do músculo de ratos diabéticos e saudáveis. Outra

questão a ser respondida é qual a importância deste aporte de AG transferidos para a musculatura esquelética? De que maneira o tecido receptor poderia utilizar o AG fornecido pelas células do Sistema Imunitário?

Dependendo do tipo do AG presente nos FL de membrana observa-se diferentes efeitos biológicos dos mediadores lipídicos intracelulares (HIRABARA *et al.*, 2003 e SCHIMITS-PEIFLER, 2000). O estudo dos AG presentes em FL e no plasma de pacientes com Diabetes Mellitus do tipo II, mostrou que, a quantidade de ácido dihomog- $\gamma$ -linolênico (DGLA), AA, ácido  $\alpha$ -linolênico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) estão diminuídas quando comparados ao controle e foi sugerido ser devido a desnaturação pelos radicais livres, pelo menos em parte (DAS, 1995). DGLA e AA (família n-6) formam precursores para as prostaglandinas E1 (PGE1), prostaciclina (PGI2 e PGI3), que são anticoagulantes e vasodilatadores que podem prevenir trombose e aterosclerose (DAS, HORROBIN e BEGIN, 1988). Borkman *et al.* (1993) mostraram que a diminuição da sensibilidade à insulina está relacionada com concentrações baixas de AG poliinsaturados (DGLA, AA, EPA e DHA) na fração fosfolipídica do músculo esquelético. Portanto, é possível que alterações na composição de AG dos FL estejam relacionados com a patogênese da diabetes, RI e outras doenças (DAS, 1995).

A análise por cromatografia de camada delgada (TLC) do músculo esquelético de ratos diabéticos indicou alteração na fração lipídica a partir do AA, AL e AO, com exceção do AP, quando comparado ao controle. Embora a musculatura dos ratos diabéticos tenham incorporado a mesma porcentagem do AA, o tecido o fraciona de maneira diferente (Tabela 01). Houve aumento na incorporação do AA em Ecol, TAG, AL, Col e LP de 3,4%, 6,7%, 3,2%, 4,9% e 5,5% respectivamente, e diminuição na fração fosfolipídica de 24% no músculo de ratos diabéticos. Não foi observada alteração na porcentagem de incorporação e nem no fracionamento do AO pela musculatura esquelética (Tabela 02). Houve pequeno desvio do fracionamento deste AG para a porção fosfolipídica de 8% no músculo de ratos diabéticos. Assim, da mesma forma observada para o AA, houve aumento na incorporação do AL em Ecol, TAG, AL, Col e LP de 2,4%, 7%, 5,4%, 5,2% e 4,9% respectivamente, e diminuição de 25% na fração fosfolipídica do músculo de rato diabético (Tabela 03). Quanto ao AP não houve diferença na porcentagem de transferência e nem no fracionamento deste AG pela musculatura dos ratos saudáveis e diabéticos (Tabela 04). A incorporação de AG saturados, como o AP, na fração fosfolipídica está relacionado com diminuição da ação da insulina no ME (HUNNICUT *et al.*, 1994), enquanto os AG poliinsaturados (AA, EPA, DHA - C20-C22) estão associados ao aumento da ação insulínica (SIMOPOULOS, 1994; STORZ *et al.*, 1999).

Em nosso modelo de diabetes, a secreção da insulina está diminuída fazendo com que o TAG seja ativamente hidrolizado (OTTON e CURI, 2002), elevando a concentração de AG na circulação. Neste caso, o ME parece desviar a incorporação do AA e AL em FL para as outras frações lipídicas da célula, principalmente TAG.

Embora a taxa de oxidação dos AG no músculo sóleo não tenha se alterado na condição de diabetes (PARDAL, 2002), nossos resultados mostram que o perfil de incorporação da radioatividade proveniente dos AG radiomarcados nas diferentes frações lipídicas deste tecido foi diferente, quando comparado com o grupo controle. Ao entrar na célula o AA, AO, AL e AP são rapidamente convertidos principalmente em FL, mas também em TAG, Col e LP, garantindo um influxo contínuo de AG do sobrenadante para dentro da musculatura esquelética. A incorporação do AG saturado, como o AP, pouco se altera nas situações de DM tipo I. O AP é o AG mais utilizados em estudos de metabolismo de gorduras (HIRABARA *et al.*, 2003). Além de não possuir dupla ligação, possui a menor cadeia carbônica dos quatro AG utilizados neste estudo e talvez por este motivo não seja difícil sua entrada na célula ou sua utilização, mesmo numa situação patológica onde acontece alterações profundas no metabolismo energético.

O perfil de incorporação pelos linfócitos e músculo esquelético foi diferenciado em função do tipo de AG utilizado. O número de insaturações da cadeia carbônica dos AG estudados bem como seu tamanho, provavelmente foram importantes para as diferenças observadas. A composição de AG da membrana plasmática é um fator que pode influenciar a ação da insulina. As propriedades físico-químicas da membrana plasmática são determinadas pela natureza dos AG da bicamada de FL, a qual pode influenciar a resposta da célula frente aos hormônios (HAGVE, 1988). Tem sido demonstrado que o aumento da concentração de AG poliinsaturados na membrana das células em cultura, aumentam a fluidez da membrana, o número de receptores para a insulina e a própria ação da insulina (GINSBERG, CHATERJEE e YOREK, 1987). No entanto, quando se aumenta a concentração de AG saturados na membrana, a fluidez de membrana diminui, o número de receptores para insulina reduz e a ação da insulina também diminui (GISBERG, JABOUR e SPECTOR, 1982). Foi sugerido que a insulina seja importante para explicar estes resultados, tendo o modelo experimental o de diabetes induzida por aloxana onde a principal diferença entre os grupos são os níveis deste hormônio (OTTON *et al.*, 2002).

Em resumo, nossos resultados mostram que mesmo com todas as alterações metabólicas que sabidamente ocorrem no estado diabético, não foi observada alteração na taxa de transferência dos [ $^{14}\text{C}$ ]-AG entre linfócitos e a musculatura esquelética. O transporte de AG

da circulação para as células parece ser de acordo com o gradiente de concentração, onde o aumento de AGL durante o estado diabético acarreta em aumento do transporte. Ainda, o perfil de distribuição da radioatividade proveniente dos AG radiomarcados incorporada pelo tecido acceptor foi diferente em relação ao grupo controle. Parece, então que, de alguma forma, os linfócitos interagem com este tecido através do aporte de AG, provocando modificações no seu perfil lipídico. Este achado inicial deve motivar outros estudos que procurem entender a importância deste aporte de AG para a musculatura esquelética e de que maneira os AG transferidos poderiam modular as funções metabólicas que acontecem no ME de animais diabéticos ou ainda em outras situações patológicas.

## 6 CONCLUSÃO

Os estudos de transferência dos AA, AO, AL e [ $^{14}\text{C}$ ]-AP de linfócitos para a musculatura esquelética de ratos saudáveis e diabéticos permitiu concluir que os linfócitos de ratos diabéticos apresentaram menor incorporação de AG radiomarcados e a taxa de transferência para o ME não se altera nesta situação patológica. Tanto nos linfócitos quanto na musculatura esquelética, o [ $^{14}\text{C}$ ]-AA foi, significativamente, o AG mais incorporado.

Embora os linfócitos de ratos diabéticos transfiram AG para o ME com a mesma capacidade que o grupo controle, este aporte de AG foi capaz de provocar alterações no perfil de distribuição da radioatividade proveniente dos AA, AO e [ $^{14}\text{C}$ ]-AL nas diferentes frações lipídicas do ME. Na situação de diabetes, a distribuição da radioatividade proveniente dos AA e [ $^{14}\text{C}$ ]-AL é desviada da fração fosfolipídica para as outras frações principalmente TAG. Diferentemente, a maior parte da radioatividade proveniente do [ $^{14}\text{C}$ ]-AO é incorporada em FL.

Os linfócitos circulantes constituem em fonte adicional de AG para a musculatura esquelética de ratos saudáveis e diabéticos também na situação de diabetes. Além de prover substrato energético, pode talvez modular a atividade metabólica e conseqüentemente regular a função do tecido, principalmente numa situação patológica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEL, A.; NAVAL, J.; GONZÁLEZ, B.; TORRES, J.M.; MISHAL, Z.; URIEL, J.; PIÑEIRO, A. Fatty acid metabolism in human lymphocytes. I. Time-course changes in fatty acid composition and membrane fluidity during blastic transformation of peripheral blood lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1044, p.323-331, 1990 A.

ANEL, A.; NAVAL, J.; GONZÁLEZ, B.; URIEL, J.; PIÑEIRO, A. Fatty acid metabolism in human lymphocytes. II. Activation of fatty acid desaturase-elongase systems during blastic transformation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1044, p.332-339, 1990 B.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. **Biochemical Journal**, v.208, p.743-748, 1982.

ATKINSON, M.; MACLAREN, N. The pathogenesis of insulin-dependent Diabetes Mellitus. **New England Journal of Medicine**, v.331, p.1428-1436, 1994.

BODEN, G.; CHEN, X.; RUIZ, J.; WHITE, J.V.; ROSSETTI, L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. **The Journal of Clinical Investigation**, v.93, p.2438-2446, 1994.

BODEN, G. Fatty acids and insulin resistance. **Diabetes Care**, v. 19, n.4, p. 394-395, april, 1996.

BORKMAN, M.; STORLIEN, L.H.; PAN, D.A.; JENKINS, A.B.; CHISHOLM, D.J.; CAMPBELL, L.V. The relation between insulin sensitivity and the fatty acid composition of skeletal muscle phospholipids. **New England Journal of Medicine**, v.328, p.238-244, 1993.

BROWN, R.E.; STEELE, R.W.; MARMER, D.J.; HUDSON, J.L.; BRESTER, M.A. Fatty acids and the inhibition of mitogen-induced lymphocyte transformation by leukemic serum. **Journal of Immunology**, v.131, p.1011-1016, 1983.

CALDER, P.C. Fatty acids, dietary lipids and lymphocyte functions. **Biochemical Society Transactions**, v.23, p.302-309, 1995.

CALDER, P.C. Can n-3 polyunsaturated fatty acids be used as immunomodulatory agents? **Bochemical Society Transactions**, v.24, p.211-220, 1996 A.

CALDER, P.C. Effects of fatty acids and dietary lipids on cell of the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.55, p.127-150, 1996 B.

CARVALHO, E.; RONDINONE, C.; SMITH, U. Insulin resistance in fat cells from obese Zucker rats - evidence for an impaired activation and translocation of protein kinase B and glucose transporter 4. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.206, n.1-2, p.07-16, march 2000.

CHEN, N.G. & REAVEN, G.M. Fatty acid inhibition of glucose-stimulated insulin secretion is enhanced in pancreatic islet from insulin-resistant rats. **Metabolism**, v.48, p.1314-1317, 1999.

CLEVENGER, C.V.; ALTMANN, S.W.; PRYSTOWSKY, M.V. Requirement of nuclear prolaction for interleukin kin-2-stimulated proliferation of T lymphocytes. **Science**, v.253, p.77-78, 1991.

COMBETTES-SOUVERAIN, M. & ISSAD, T. Molecular basis of insulin action. **Diabetes & Metabolism**, v.24, n.6, p.477-489, december 1998.

CRABTREE, B. & NEWSHOLME, E.A. A quantitative approach to metabolic control. **Current Topics of Cellular Regulation**, v.25, p.21-76, 1985.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; NEWSHOLME, E.A. Intracellular distribution of some enzymes of the glutamine utilisation pathway in rat lymphocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.138, n.1, p.318-322, 1986.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; NEWSHOLME, E.A. Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. **Bochemical Journal**, v.250, p.383-388, 1988.

CURI, R.; WILLIAMS, J.F.; NEWSHOLME, E.A. Pyruvate metabolism by lymphocytes: evidence for an additional ketogenesis tissue. **Biochemistry International**, v.19, p.755-767, 1989 A.



CURI, R.; WILLIAMS, J.F.; NEWSHOLME, E.A. Formation of ketone bodies by resting lymphocytes. **International Journal of Biochemistry**, v.21, p.1133-1136, 1989 B.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; PITHON-CURI, T.C.; PIRES de MELO, M.; GARCIA, C.; HOMEM de BITTENCOURT Jr., P.I.; GUIMARÃES, A.R.P. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.15-21, 1999.

CURI, R. & PERES, C.M. Ácidos graxos como mediadores intercelulares. in: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, M.I.Y.; PROCOPIO, J. **Entendendo as gorduras: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. p.289-298.

CURI, R.; PARDAL, D.P.H.; HIBARA, S.M.; FERNANDES, L.C. Leucócitos: fonte adicional de ácidos graxos para o músculo esquelético. **Motriz**, v.7, n.1 (supl.) p.S69-S76, 2001.

CURI, R.; LAGRANHA, C.J.; GARCIA JR, J.R.; PITHON-CURI, T.C.; LANCH JR, A.H.; PELLEGRINOTTI, I.L.; PROCOPIO, J. Ciclo de Krebs como fator limitante na utilização de ácidos graxos durante o exercício aeróbico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.47, n.2, p.135-143, 2003.

DAS, U.N.; HORROBIN D.F.; BEGIN, M.E. Clinical significance of essential fatty acids. **Nutrition**, v.4, p.337-342, 1988.

DAS, U.N. Essential fatty acid metabolism in patients with essential hypertension, diabetes mellitus and coronary heart disease. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.52, p.387-391, 1995.

DE FRONZO, R.A. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dislipidaemia and atherosclerosis. **Netherland Journal of Medicine**, v.50, p.191-197, 1997.

DRESNER, A.; LAURENT, D.; MARCUCCI, M.; GRIFFIN, M.E.; DUFOUR, S.; CLINE, G.W.; SLEZAK, L.A.; ANDERSEN, D.K.; HUNDAL, R.S.; ROTHMAN, D.L.; PETERSEN, K.F.; SHULMAN, G.I. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. **The Journal of Clinical Investigation**, v.103, n.2, p.253-259, january 1999.

ENRIQUEZ, Y.R. Interpretaciones recientes sobre el metabolismo lipídico em la resistencia a la insulina. **Revista cubana Aliment Nutr**, v.16, n.1, p.54-62, 2002.

FAUSTMAN, D.; EISENBARTH, G.; DALEY, J.; BREITMEYER, J. Abnormal T-lymphocytes subsets in type I diabetes. **Diabetes**, v.38, n. 11, p.1462-1468, 1989.

FERNANDES, L.C. Metabolism of glucose, glutamine and pyruvate in lymphocytes from Walker 256 tumor-bearing rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, p.2539-2543, 1994.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

FOLSOM, A.R.; MA, J.; MCGOVERN, P.G.; ECKFELDT, H. Relation between plasma phospholipid saturated fatty acids and hyperinsulinemia. **Metabolism**, v.45, n.2, p.223-228, 1996.

FRAYN, K.N. The glucose-fatty acid cycle: a physiological perspective. **Biochemical Society Transaction**, v.31, part 6, p.1115-1119, 2003.

FUJIMOTO, W.Y. The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type II *Diabetes Mellitus*. **American Journal of Medicine**, v. 6, p. 95-145, april, 2000.

GARCIA Jr, J.R. **Transferência Lipídica de Macrófagos e Linfócitos para Ilhotas Pancreáticas Co-cultivadas**. São Paulo, 2000. Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas - USP.

GARCIA Jr, J.R.; CURI, R.; MARTINS, E.F.; CARPINELLI, A.R. Macrophages transfer [<sup>14</sup>C] - labelled fatty acids to pancreatic islet in culture. **Cell Biochemistry and function**, v.19, p.11-17, 2001.

GARCIA Jr, J.R.; LAGRANHA, C.J.; PITHON-CURI, T.C. Metabolismo dos ácidos graxos no exercício físico. in: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, M.I.Y.; PROCOPIO, J. **Entendendo as gorduras: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. p.201-214.

GINSBERG, B.H.; JABOUR, J.; SPECTOR, A.A. Effects of alterations in membrane lipid unsaturation on the properties of the insulin receptor of Ehrlich ascites cell. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.690, p.157-164, 1982.

GINSBERG, B.H.; CHATERJEE, P.; YOREK, M. Increased membrane fluidity is associated with greatest sensitivity to insulin. **Diabetes**, v.36 (suppl), p. 56 A, 1987.

GLADZ, J.F.; BORCHERS, T.; SPENER, F.; VAN DER VUSSE, G.J. Fatty acids in cell signaling: modulation by lipid binding proteins. **Prostaglandins, Lekotrienes and Essential Fatty Acids**, v.52, p.121-127, 1995.

GOODPASTER, B.H. & KELLEY, D.E. Role of muscle in triglyceride metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v.9, n.3, p.231-236, june 1998.

GRAZIOLA, F.; SOLIS V.S.; CURI, R. Estrutura química e classificação dos ácidos graxos. in: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, M.I.Y.; PROCOPIO, J. **Entendendo as Gorduras: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. p.5-23.

HAMILTON, J.A.; KAMP, F. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? **Diabetes**, v.48, p.2255-2260, 1999.

HAGVE, T.A. Effects of insaturated fatty acids on cell membrane functions. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 48, p.381-388, 1988.

HEROLD, K.C.; HUEN, A.; GOULD, L.; TRAISMAN, H.; RUBENSTEIN, A.H. Alterations in lymphocyte subpopulations in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: exploration of possible mechanisms and relationships to autoimmune phenomena. **Diabetologia**, v. 27 (suppl), p.102-105, 1984.

HIRABARA, S.M.; CARVALHO, C.R.O.; MENDONÇA, J.R.; HABER, E.P.; FERNANDES, L.C.; CURI, R. Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolism (Randle Cycle). **Federation of European Biochemical Societies letters**, v.541, p.109-114, 2003.

HOMEM de BITTENCOURT Jr.; P.I.; PERES, C.M.; YANO, M.M.; HIRATA, M.H.; CURI, R. Pyruvate is a lipid precursor for rat lymphocytes in culture: Evidence for a lipid exporting capacity. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.30, n.4, p.631-641, 1993.

HOMEM de BITTENCOURT Jr.; P.I.; CURI, R. Transfer of cholesterol from macrophages to lymphocytes in culture. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.44, n.2, p.347-362, 1998.

HUNNICUTT, J.W.; HARDY, R.W.; WILLIFORD, J.; MCDONALD, J.M. Saturated fatty acid-induced insulin resistance in rat adipocytes. **Diabetes**, v.43, n.4, p.540-545, april 1994.

HULVER, M.W.; BERGREEN, J.R.; CORTRIGHT; DUDEK, R.W.; THOMPSON, R.P.; PORIES, W.J.; MACDONALD, K.G.; CLINE, G.W.; SHULMAN, G.I.; DOHM, G.L.; HOUMARD, J.A. Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. **The American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v.284, p.E741-E747, 2003.

KAMP, F. & HAMILTON, J.A. Movement of fatty acids, fatty acid analogues and bile acids across phospholipid bilayers. **Biochemistry**, v.32, p.11074-11086, 1993.

KAABA, S.A.; AL-HARBI, S.A. Abnormal lymphocyte subsets in Kuwaiti patients with type-1 insulin-dependent diabetes mellitus and their first-degree relatives. **Immunology letter**, v.47, n.3, p.209-213, 1995.

KÄNEL, R.; MILLS, P.J.; DIMSDALE, J.E. Short-term hyperglycemia induces lymphopenia and lymphocyte subset redistribution. **Life Sciences**, v.69, p.255-262, 2001.

KELLEY, D.E.; GOODPASTER, B.; WING, R.R.; SIMONEAL, J.-A. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity and weight loss. **American Journal of Physiology**, v.277, Endocrinology and Metabolism 40, p.E1130-E1141, 1999.

KELLEY, D.E. & GOODPASTER, B. Skeletal muscle triglyceride: an aspect of regional adiposity and insulin resistance. **Diabetes Care**, v.24, n.5, 2000.

KELLEY, D.E. & MANDARINO, L.J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance. **Diabetes**, v.49, p.677-683, 2000.

KRUSZYNSKA, Y.T. & OLEFSKY, J.M. Cellular and molecular mechanisms of non-insulin dependent diabetes mellitus. **Journal of investigative Medicine**, v.44, n.8, p.413-428, october 1996.

LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J.F.; CORMONT, M.; RICORT, J.M.; GRÉMEAUX, T.; GRILLO, S. From insulin receptor signalling to Glut 4 translocation

abnormalities in obesity and insulin resistance. **Journal of Receptor and Signal Transduction Research**, v.19, n.1-4, p.217-228, july 1999.

LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. Molecular mechanisms of insulin action in normal and insulin-resistant state. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v.107, n.2, p.126-132, 1999.

LUIKEN, J.J.F.P.; SCHAAP, F.G.; VAN NIEUWENHOVEN, F.A.; VAN DER VUSSE, G.L.; BONEN, A.; GLATZ, J.F.C. Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. **Lipid**, v. 34 (suppl), p. S169-S175, 1999.

LUIKEN, J.J.F.P.; TURCOTTE, L.P.; BONEN, A. Protein-mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicle. **Journal of Lipid Research**, v. 40, p.1007-1016, 1999.

MAASSEN, J.A. & OUWENS, A. Mechanism of insulin action: molecular pathogenesis of *Diabetes Mellitus*. **Front Hormone Research Basel**, v. 22, p. 201-221, 1997.

MANCO, M.; MINGRONE, G.; GRECO, A.V.; CAPRISTO, E.; GNIULI, D.; DE GAETANA, A.; GASBARRINI, G. Insulin resistance directly correlates with increased saturated fatty acids in skeletal muscle triglycerides. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v.49, n.2, p.220-224, february 2000.

MARX, J. The cell cycle: spinning further a field. **Science**, v.252, p.1490-1492, 1991.

MASON, T.M.; GOH, T.; TCHIPASHVILI, V.; SANDHU, H.; GUPTA, N.; LEWIS, G.F.; GIACCA, A. Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose *in vivo* in rats. **Diabetes**, v.48, n.3, p.524-530, march 1999.

McARTHUR, M.J.; ATSHAVES, B.P.; FROLOV, A.; FOXWORTH, W.D.; KIER, A.B.; SCHROEDER, F. Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. **Journal of Lipid Research**, v.40, p.1371-1383, 1999.

MOUTSCHEN, M.P.; SCHEEN, A.J.; LEFEBVRE, P.J. Impaired immune responses in diabetes mellitus: analysis of the factors and mechanisms involved. **Diabetes Metabolism**, v. 18, p.187-201, 1992.

NEWSHOLME, E.A.; LEECH, A.R. **Biochemistry for the Medical Sciences**. New York : John Wiley & Sons, 1983.

NEWSHOLME, P.; CURI, R.; GORDON, S.; NEWSHOLME, E.A. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. **Biochemical Journal**, v.239, p.121-125, 1986.

NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.; YAQOOB, P. The regulatory, informational and immunomodulatory roles of fat fuels. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, n.5, p.738S-750S, 1993.

NEWSHOLME, P.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C.; MURPHY, C.J.; GARCIA, C.; PIRES-de-MELO, M. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages and neutrophils: It's importance in health and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.10, p.316-324, 1999.

NISHIYAMA-NARUKE, A.; CURI, R. Phosphatidylcholine participates in the interaction between macrophages and lymphocytes. **American Journal of Physiology**, v.278, p.C554-560, 2000.

OTTON, R. **Metabolismo e Função de Linfócitos de Ratos Diabéticos**. São Paulo, 2001. p.124. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas - USP.

OTTON, R.; MENDONÇA, J.R.; CURI, R. Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism. **Journal of Endocrinology**, v.174, p.55-61, 2002.

OTTON, R.; CARVALHO, C.R.O. MENDONÇA, J.R.; CURI, R. Low proliferation capacity of lymphocytes from alloxan-diabetic rats. Involvement of high glucose and tyrosine phosphorylation of Shc and IRS-1. **Life Sciences**, v.71, p.2759-2771, 2002.

OTTON, R. & CURI, R. Metabolismo dos ácidos graxos no jejum e diabetes. in: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, M.I.Y.; PROCOPIO, J. **Entendendo as Gorduras: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. p.189-197.

PALANCH, A.C. **Interação de Enterócitos com Linfócitos e Macrófagos Através da Transferência de Colesterol**. São Paulo, 2000. p.130. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas - USP.

PARDAL, D.P.H. **Estudo de la transferencia de lipidios de las células del sistema inmune al tejido muscular esquelético**. León, 2002. p.78. Tese de doutorado. Departamento de Fisiologia - Universidade de León.

PERES, C.M. **Transferência de Ácidos Graxos entre Macrófagos e Linfócitos**. São Paulo, 1997. p.70. Tese de mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas - USP.

PERES, C.M.; HOMEM de BITTENCOURT Jr.; P.I.; COSTA, M.; CURI, R.; WILLIAMS, J.F. Evidence for the transfer in culture of [ $^{14}\text{C}$ ] - labelled fatty acids from macrophages to lymphocytes. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.43, n.5, p.1137-1144, 1997.

RANDLE, P.J.; GARLAND, P.B.; HALES, C.N.; NEWSHOLME, E.A. The glucose-fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, p.785-789, 1963.

RANDLE, P.J.; PRIESTMAN, D.A.; MISTRY, S.; HALSALL, A. Mechanisms modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. **Diabetologia**, v.37, n.2 (Suppl), p.S155-S161, 1994.

RANDLE, P.J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: The glucose fatty acid cycle after 35 years. **Diabetes/Metabolism Reviews**, v.14, p.263-283, 1998.

REAVEN, G.M.; HOLLENBECK, C.; JENG, C.Y.; WU, M.S.; CHEN, Y.D. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate and insulin for 24 hour in patients with NIDDM. **Diabetes**, v.37, p.1020-1024, 1988.

RODEN, M.; THOMAS, B.P.; PERSEGHIN, G.; PETERSEN, K.F.; ROTHMAN, D.L.; CLINE, G.W. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. **Journal of Clinical Investigation**, v.97, n.12, p.2859-2865, 1996.

SCHMITZ-PEIFFER, C. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. **Cellular Signalling**, v.12, p.583-594, 2000.

SIMOPOULOS, A. In insulin resistance influenced by dietary linoleic acid and trans fatty acids?. **Free radical Biology & Medicine**, v.17, n.4, p.367-372, 1994.

STORCH, J.; THUMSER A.E.A. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1486, p.28-44, 2000.

STORZ, P.; DÖPPLER, H.; WERNIG, A.; PFIZENMAIER, K.; MÜLLER, G. Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells palmitate rather than tumor necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/Akt stimulation and glucose uptake. **European Journal of Biochemistry**, v.266, n.1, p.17-25, november 1999.

STULNIG, T.M.; BERGER, M.; RODEN, M.; STINGL, H.; RAEDERSTORFF, D.; WALDHÄUSL, W. Elevated serum free fatty acid concentrations inhibit T lymphocyte signaling. **The FASEB Journal**, v.14, p.939-947, 2000.

TURCOTTE, L.P. Muscle fatty acid uptake during exercise: possible mechanisms. **Exercise Sport Science Review**, v. 28,p.4-9, 2000.

URIEL, J.; TORRES, J.M.; ANEL, A. Carrier-protein-mediated enhancement of fatty acid binding and internalization in human T-lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1220, p. 231-240, 1994.

VESSBY, B. Dietary fat and insulin action in humans. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.83 (Suppl. 1), p. S91-S96, march 2000.

YAQOOB, P.; NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. Fatty acid oxidation by lymphocytes. **Biochemical Society Transactions**, v.22, n.2, p.116S, 1994.

YEAGLE, P.L. Lipid regulation of cell membrane structure and function. **The FASEB Journal**, v.3, p.1833-1842, may 1989.

YECHOOR, V.K.; PATTI, M.E.; SACCONI, R.; KAHN, C.R. Coordinated patterns of gene expression for substrate and energy metabolism in skeletal muscle of diabetic mice. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v.99, n.16, p.10587-10592, august 2002.